Introduction	Quantification moléculaire	Sources et comportements	Conclusions	Perspectives
Contexte scientifique	Développement qPCR	Caractérisation des sols	Sources	Comparaison de génomes
Bibliographie	Validation qPCR	Impact du ruissellement	Comportements	Intérêt sanitaire
Objectifs	Choix de l'extraction d'ADN	Efficacité de STEP	Traitements	Remerciements







Soutenance de thèse de doctorat Sciences et Techniques de l'Environnement

Nicolas RADOMSKI



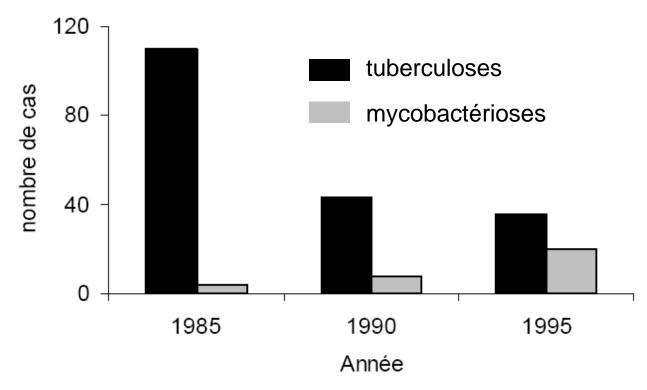
Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains

Sources des mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) dans les bassins versants



Alors que l'incidence de la tuberculose diminue en France métropole, celle des mycobactérioses augmente

Evolution du nombre de cas de mycobactérioses humaines



Nombre de cas de tuberculoses et de mycobactérioses au CHU de Nancy entre 1985 et 1995 suivant une même méthode de détection [1]

Bibliographie

Objectifs

Introduction Quantification moléculaire

Sources et comportements

Conclusions

Perspectives

Contexte scientifique

Bibliographie

Objectifs

Trois formes de mycobactérioses : cutané, respiratoire et iatrogène

Formes des mycobactérioses humaines



Nodules et ulcères d'un jambe provoqués par M. abscessus [2]



Nodules des lobes des deux poumons provoqués par *M. abscessus, M. avium* et *M. simiae* [3]



Lésions nodulaires au point d'entrée d'une exploration laparoscopique abdominale provoquées par *M. chelonae* [4]

^[3] Giron, R.M. et al. (2005). Arch. Bronconeumol. 41(10): 560-565

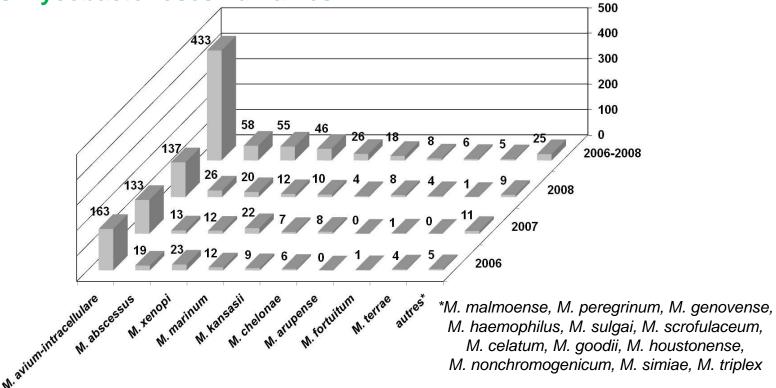
Contexte scientifique

Bibliographie

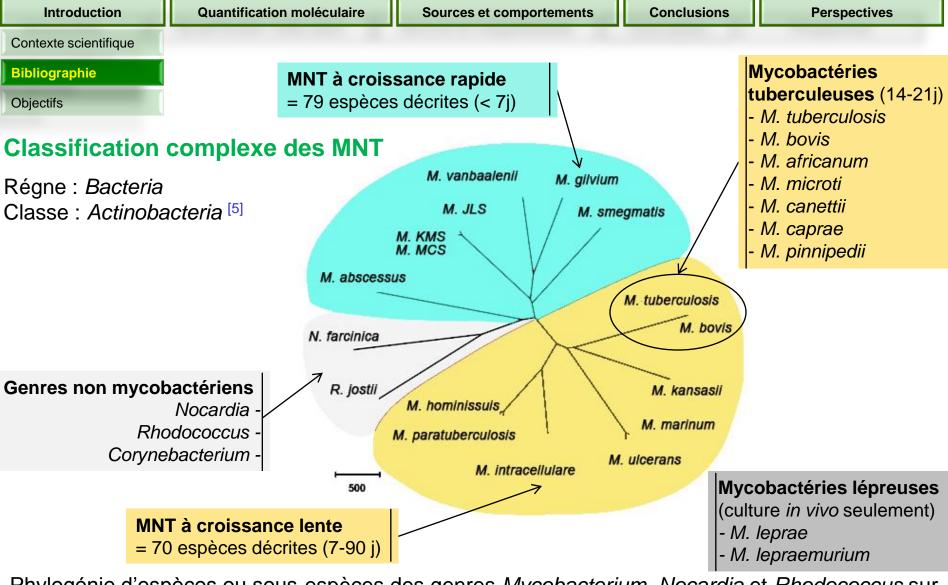
Objectifs

Estimation d'environ 5000 cas de mycobactérioses en France pour l'année 2007

Incidence des mycobactérioses humaines



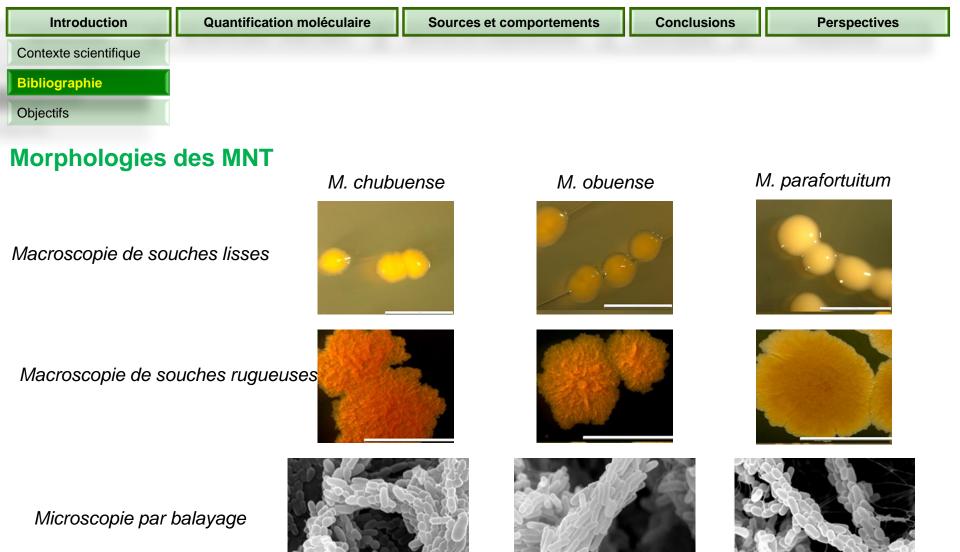
Mise en forme des données du nombre de cas de mycobactérioses humaines recensées dans les 20 centres hospitaliers français (12 concernant *M. marinum*) entre 2006 et 2008 ^[5]



Phylogénie d'espèces ou sous-espèces des genres *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus* sur la base de la comparaison des protéines de leurs génomes par méthode Neighborhood-Joining [6]

^[5] Holt J.G. (1989) Bergey's manual of systematic and bacteriology Eds. Baltimore, USA, in Williams and Wilkins

^[6] Veyrier F. et al. (2009). BMC Evol. Biol. 196(8): 1-14



Morphologie d'espèces de MNT cultivées sur gélose Trypticase soja (échelle macroscopique de 1 cm et microscopique de 3,8 μm) [7]

Introduction **Conclusions** Quantification moléculaire Sources et comportements **Perspectives**

Contexte scientifique

Bibliographie

Objectifs

En l'absence de transmission inter-espèces connues, l'environnement est une considéré comme une source probable de MNT [8]

Prévalence environnementale qualitative des MNT

Eau



Réseau d'eau de distribution [9]



Système de potabilisation [10]



Résistent au chlore [11]



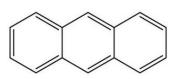
Eau à pH acide [12]



Pâturage [13]



Riches en acides humiques et fulviques [14]



Sol

Riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques biodisponibles [15]

- [8] Radomski, N. et al. (2010). J. Clin. Microbiol. 48(4): 1026-1034
- [9] Falkinham III, J.O. et al. (2001). Appl. Environ. Microbiol. 67(3): 1225-1231 [10] Le Dantec, C.. et al. (2002). Appl. Environ. Microbiol. 68(11): 5318-5325
- [11] Steed, K.A. et al. (2006). Appl. Environ. Microbiol. 72(6): 4007-4011
- [12] livanainen, E.K. et al. (1993). Appl. Environ. Microbiol. 59(2): 398-404
- [13] Whittington, R.J. et al. (2004). Appl. Environ. Microbiol. 70(5): 2989-3004
- [14] Kirschner, P. et al. (1993). J. Clin. Microbiol. 31(11): 2882-2889
- [15] Uyttebroek, M. et al. (2006). Environ. Microbiol. 8(5): 836-847

Introduction Quantification moléculaire

Contexte scientifique

Bibliographie

Objectifs

Peu d'études en France de quantification des MNT dans l'environnement

Sources et comportements

Conclusions

Perspectives

Prévalence environnementale quantitative des MNT

Type d'eau	Pays	UFC / I ou g	Référence
ruisseau	Finlande	$8,0.10^2$ - $2,2.10^3$	[16]
biofilm (eau potable)	Afrique du Sud	$0,1.10^{1}$ - $4,6.10^{5}$	[17]
réseau d'eau potable	USA	$0,2.10^{1}$ - $1,0.10^{3}$	[18]
réseau d'eau potable	Plusieurs	$0,1.10^{1}$ - $3,5.10^{3}$	[19]
milieu naturel	Finlande	$9,7.10^2$ - $5,8.10^3$	[20]
réseau d'eau potable	Finlande	$0,1.10^{1}-1,0.10^{3}$	[21]
souterraines et de réseaux	France	$0,1.10^{1}-5,0.10^{2}$	[10]
ruisseau	Finlande	$0,1.10^{1}-2,2.10^{3}$	[12]
sols	Finlande	$1,0.10^7$ - $1,0.10^8$	[22]
sols humiques	Finlande	$1,0.10^5$ - $1,0.10^6$	[22]
sols neutres	Malawi	2,0.10 ² -1,0.10 ⁴	[23]

Rares cas d'études de quantification non normalisées des MNT dans des échantillons positifs de milieux aquatiques et terrestres

[16] Torkko, P. et al. (2002). J. Syst. Evol. Microbiol. 52(5): 1519-1525[17] September, S.M. et al. (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70(12): 7571-7573

[18] Hilborn, E.D., et al. (2006). Appl. Environ. Microbiol. 72(9): 5864-5869

[19] Vaerewijck, M.J.M. et al. (2005) FEMS Microbiol. Rev. 29(1): 911-934

[20] Torkko, P. et al. (2001). J. Clin. Microbiol. 39(1): 207-211

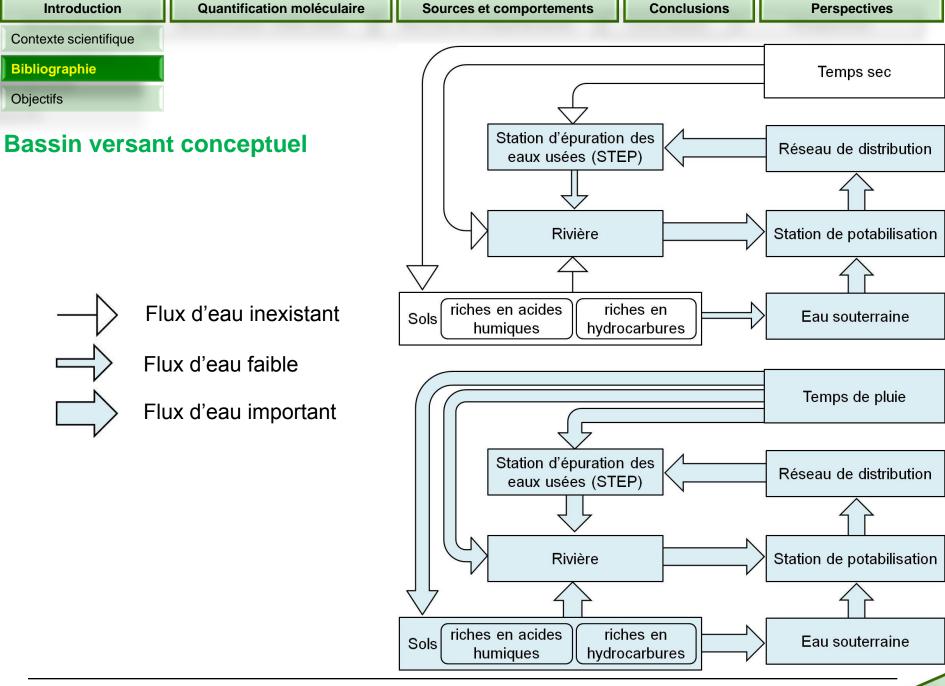
[21] Torvinen, E. et al. (2004). Appl. Environ. Microbiol. 70(4): 1973-1981

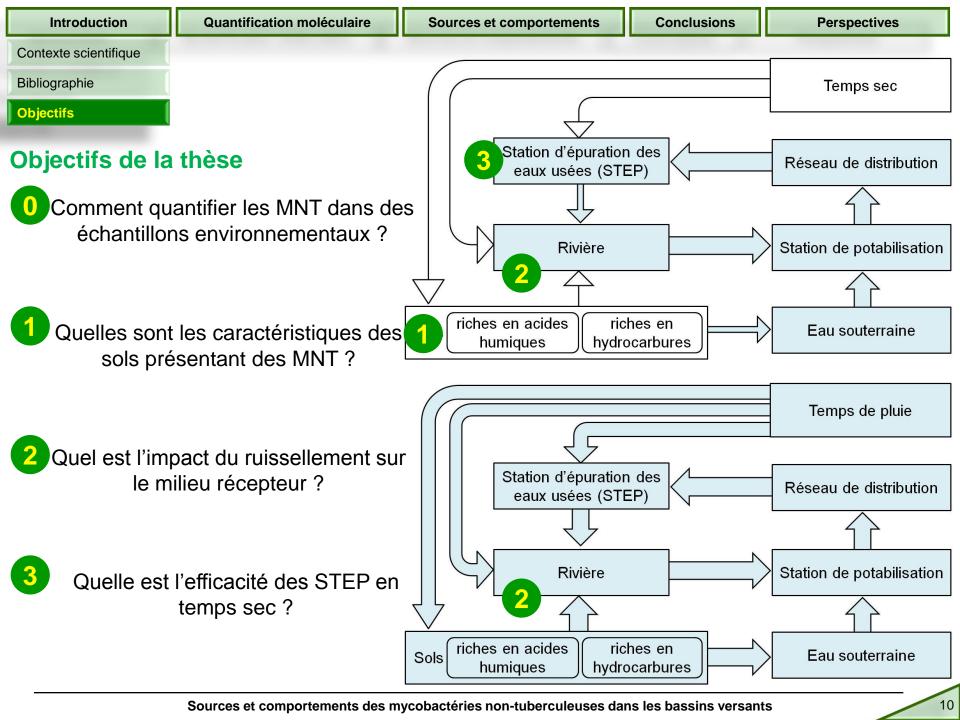
[10] Le Dantec, C., et al. (2002). Appl. Environ. Microbiol. 68(11): 5318-5325

[12] Iivanainen, E.K. et al. (1993). Appl. Environ. Microbiol. 59(2): 398-404

[22] Nieminen, T. et al. (2006). J. Microbiol. Meth. 67(1): 44-55

[23] Chilima, B.Z. et al. (2006) Appl. Environ. Microbiol. 72(4): 2343-2350





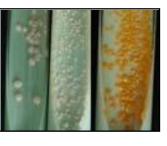


Travaux en bactériologie



1 : Stratégie adoptée

Comparaison des protocoles de bactériologie dans un objectif de quantification des MNT dans l'environnement



2: Résultats obtenus [24]

- Isolement de l'eau de surface de plusieurs espèces de MNT à croissance rapide
- Quantification non reproductible en raison de microorganismes interférents
- Sous-estimation de la quantité en raison de la létalité des décontaminants



3 : Révision de la stratégie

Développement d'une méthode de quantification par PCR en temps-réel (qPCR)

Quantification moléculaire	S	Sources et comportements	Conclusions	Perspectives
Développement qPCR				
Validation qPCR		Dublication on	2010 dans An	
Choix de l'extraction d'ADN		Environmental Mic	n 2010 dans <i>Ap</i> crobiology 76(11	

A retenir des travaux en bactériologie

Introduction

Sous-estimation et non reproductibilité de la quantification dans l'eau de surface [24]

Identification d'espèces potentiellement pathogènes dans l'eau de surface, en particulier *M. chelonae* [24]

Espèces de MNT	UFC par boîtes	Pathologie chez l'homme	Référence
M. chelonae	15/8/5, 2/8/11, 6/9/19, 15/8/22	cutanée, respiratoire, iatrogène	[25]
M. porcinum	1/0/0	ostéomyélite post-opératoire	[26]
M. austroafricanum	5/0/0	arthrite septique	[27]
M. psychrotolerans	1/0/0	/	[28]
M. insubricum	1/0/0	sans causer de pathologie	[29]
M. arupense	1/0/0	ténosynovite palmaire	[30]
M. Ilatzerense	1/0/0	1	[31]
M. setense	1/0/0	infection post-traumatique des os et de	[32]
		la peau suite à une greffe osseuse	
		buccale	

Connaissances sur les mycobactéries isolées de l'eau de la Seine au niveau de la prise d'eau de l'usine de potabilisation de Orly

[24] Radomski, N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(11): 3514-3520 [25] Kwan, K. and HoS.T. (2010) *lind. J. Med. Microbiol.* 28(3): 248-250

[26] Wallace, R.J. et al. (2004) J. Clin. Microbiol. 42(12): 5689-5697 [27] van der Heijden, I.M. et al. (1999) Rheumatol. 38(1): 547-553

[28] Trujillo, M. et al. (2004) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54(5): 1459-1463

[29] Tortoli, E. et al. (2009) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(6): 1518-1523

[30] Cloud, J.L. et al. (2006) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(6): 1413-1418

[31] Gomila, M. et al. (2008) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58(12): 2769-2773 [32] Lamy, B. et al. (2008) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58(2): 486-490



Publication en 2010 dans Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology 2(2): 1551-1561

Conclusions

Perspectives

Matériel et méthodes

Paramètres de comparaison [33]

Spécificité Sp = proportion de microorganismes non ciblés qui ne sont pas détectés

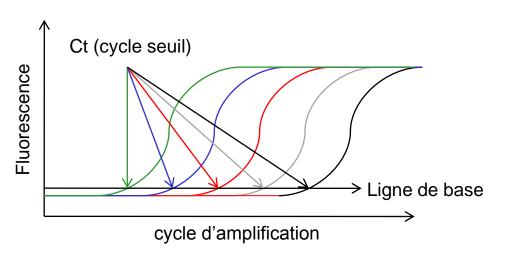
Sensibilité Ss = proportion de microorganismes ciblés qui sont détectés

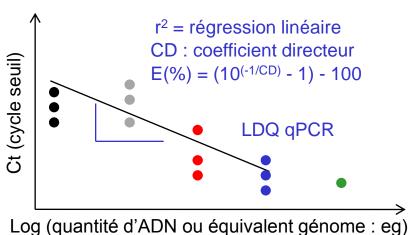
Limite de quantification LDQ = plus faible quantité d'équivalent génome quantifiable

Efficacité de qPCR E = proportion relative d'ADN détecté

Coefficient de régression linéaire r² = degré de corrélation entre la détection et la quantification

Sources et comportements





[33] Radomski, N. et al. (2010) Cur. Res. Micrib. Biotech. 2(2): 1551-1561 [34] Fogel, G.B. et al. (1999) Microb. Ecol. 38(2): 93-113

équivalent génome (eg) : 1 génome de *M. chelonae* = 4,4 fg [34]



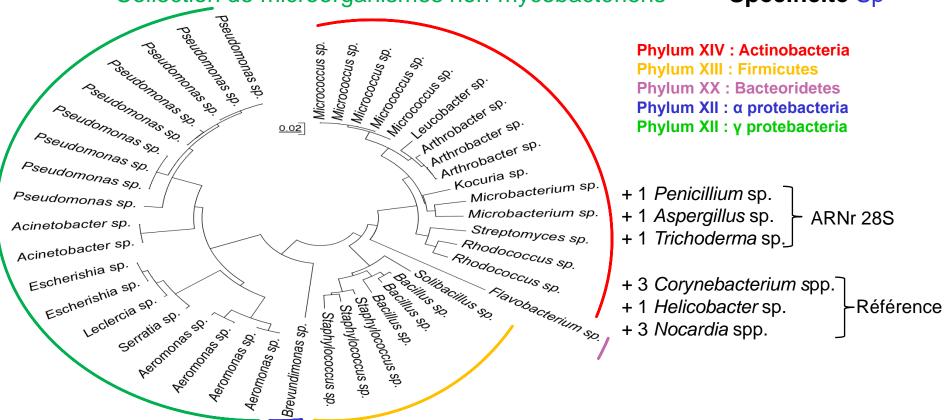
Collection de 30 espèces de mycobactéries [35] = Sensibilité Ss

MNT de référence	MNT de référence	MNT de la Seine [24] Complexe tuberculeux
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	M. nonchromogenicum	M. arupense M. bovis BCG
M. chelonae spp. abscessus	M. peregrinum	M. austroafricanum M. tuberculosis H37Rv
M. chelonae spp. chelonae	M. scrofulaceum	M. insubricum
M. gadium	M. simiae	M. llatzerense
M. gordonae	M. smegmatis	M. psychrotolerans
M. fortuitum spp. fortuitum	M. szulgai	M. porcinum
M. intracellulare	M. terrae	M. setense
M. kansasii	M. tusciae	
M. lentiflavum	M. ulcerans	
M. marinum	M. xenopi	
M. mucogenicum		

Espèces de MNT présentant une incidence chez l'homme et une occurrence dans le milieu aquatique significatives, et espèce de mycobactéries du complexe tuberculeux



Collection de microorganismes non-mycobactériens [35] = Spécificité Sp



Dendrogramme (Distance : Kimura's Two-parameter, Embranchement Neighbor-Joining) du séquençage de l'ARNr 16S de 43 bactéries isolées de la Seine

[35] Radomski, N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(11): 3514-3520



Stratégie

Evaluation *in silico* de la spécificité et de la sensibilité de 19 couples d'amorces PCR de la littérature par l'algorithme BLAST

Evaluation in vitro de la spécificité de 8 couples d'amorces sélectionnées par PCR conventionnelle sur une collection de génomes non-mycobactériens isolés de la Seine et identifiés par séquençage

Utilisation du couple d'amorces le plus spécifique pour étudier l'influence de la balanced heminested qPCR (B-HN qPCR) [36]

Utilisation de la méthode d'amplification la plus stable pour optimiser la qPCR sur la base :

- du ratio de concentration en amorce
- de la concentration en sonde
- de la concentration en MgCl₂

Développement qPCR
Validation qPCR

Choix de l'extraction d'ADN

Amorces PCR retenues : 110F/I571R

Conclusions

Perspectives

Résultats

Evaluation in vitro de la spécificité des 8 amorces retenues

Amorces	Gène	Nombre d'amplifications	Nombre d'amplifications	Nombre d'amplifications	Spécificité Sp	Référence
		importantes	faibles	négatives	(%)	
gyrBA/gyrBE	gyrB	56	1	0	0,0	[38]
Z261/Z212	sodA	24	23	10	17,5	[39]
FSodF/RSodR	sodA	21	12	24	42,1	[40]
F246/R266267	ARNr 16S	8	24	25	43,9	[41]
MycF/MycR	ARNr 16S	12	13	32	56,1	[42]
Tb11/Tb12	hsp65	9	3	45	78,9	[43]
110F/I571R	ARNr 16S	1	3	53	93,0	[44]
F119/R184T7	gyrB	3	0	54	94,7	[45]

Sources et comportements

Evaluation de la spécificité des amorces par PCR conventionnelle

^[38] Dauendorffer, N.J. et al. (2003) J. Clin. Microbiol. 41(3): 1311-1315

^[39] Zolg, J.W. et al. (1994) J. Clin. Microbiol. 32(11): 2801-2812

^[40] Domenech, P. et al. (1997) J. Sysyt. Bacteriol. 47(2): 535-540

^[41] Boddinghaus, B. et al. (1990) Clin. Microbiol. 28(8):1751-1759

^[42] Mendum T.A. et al. (2000) FEMS Microbiol. Lett. 185(2): 189-192

^[43] Telenti, A. et al. (1993) J. Clin. Microbiol. 32(2): 175-178

^[44] Garcia-Quintanilla, A. et al. (2002) J. Clin. Microbiol. 40(12): 4646-4651

^[45] Fukushima, M. et al. (2003) J. Clin. Microbiol. 41(6): 2605-2615



A retenir

Aucun couple d'amorce PCR de la littérature étudiée ne s'est avéré totalement spécifique des mycobactéries par PCR conventionnelle [35]

La pré-amplification B-HN qPCR ne permet pas une quantification reproductible [35]

La méthode de qPCR développée doit être validée en étant comparée à d'autres méthodes de la littérature [35]



Comparaison à deux méthodes de la littérature

Méthode qPCR					
Radomski et al. [35]	Dutil <i>et al</i> . [36]	Tobler <i>et al</i> . [37]			
TaqMan ®	SyberGreen ®	TaqMan ®			
ARNr 16S	ARNr 16S	hsp65			
Méthode développée pendant la thèse	Méthode appliquée à l'eau sans vérification de spécificité	Méthode développée et testée uniquement sur de l'ADN de <i>Candida albicans</i>			

Méthodes qPCR comparées

Paramètres de comparaison [33, 34]

Spécificité Sp = proportion de microorganismes non ciblés qui ne sont pas détectés

Sensibilité Ss = proportion de microorganismes ciblés qui sont détectés

Limite de quantification LDQ = plus faible quantité d'équivalent génome quantifiable

Efficacité de qPCR E = proportion relative d'ADN détecté

Coefficient de régression linéaire r² = degré de corrélation entre la détection et la quantification

^[33] Radomski, N. et al. (2010) Cur. Res. Micrib. Biotech. 2(2): 1551-1561

^[34] Fogel, G.B. et al. (1999) Microb. Ecol. 38(2): 93-113

^[35] Radomski N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(21): 7348-7351

^[36] Dutil, S. et al. (2007) Environ. Microbiol. 9(11): 2836-2843

^[37] Tobler, N.E. et al. (2006) J. Microbiol. Meth. 66(1): 116-124

Résultats

A contrario des deux autres, la méthode développée est totalement spécifique mais pas totalement sensible, et les trois méthodes ont une efficacité comparable

Conclusions

Perspectives

Footouro		Méthode qPCR	
Facteurs	Radomski et al. [35]	Dutil et al. [36]	Tobler et al. [37]
E (%)	74,26±1,74	74,40±3,32	74,19±1,95
r² (%)	98,60±0,16	$98,81\pm0,01$	$98,34\pm0,93$
LDQ (fg)	[346; 1731]	[69; 346]	[69; 346]
LDQ (eg)]79; 393]]16; 79]]16; 79]
Ct max	38,43±0,16	35,00±1,54	38,19±1,37

Sources et comportements

Efficacité (E), coefficient de régression (r²), limite de quantification (LDQ) et du cycle seuil de la LDQ (Ct max) en fonction des méthodes de qPCR

Méthode de qPCR	Nombre d'espèces de Mycobacterium détectées (30 espèces testées)	Nombre de genres non mycobactériens détectés (24 genres testés)	Ss (%)	Sp (%)
Radomski et al. [35]	23	0	77	100
Dutil et al. [36]	30	13	100	44
Tobler et al. [37]	30	2	100	91

Sensibilité (Ss) et spécificité (Sp) des méthodes qPCR

^[35] Radomski N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(21): 7348-7351

^[36] Dutil, S. et al. (2007) Environ. Microbiol. 9(11): 2836-2843[37] Tobler, N.E. et al. (2006) J. Microbiol. Meth. 66(1): 116-124



A retenir

Les méthodes de quantification par qPCR de Dutil *et al*. [36] et Tobler *et al*. [37] sont totalement sensibles mais non-spécifiques (*Rhodococcus* spp. détectées en particulier)

La méthode qPCR développée [35] n'est pas totalement sensible mais est totalement spécifique

	-
M. arupense	M. nonchromogenicum
M. gadium	M. psychrotolerans
M. lentiflavum	M. szulgai
	M. tusciae

Espèces de MNT non détectées par la méthode qPCR développée [24]

Une méthode efficace d'extraction d'ADN doit être sélectionnée en vue d'appliquer la méthode qPCR développée [36]

[35] Radomski N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(21): 7348-7351

[36] Dutil, S. et al. (2007) Environ. Microbiol. 9(11): 2836-2843 [37] Tobler, N.E. et al. (2006) J. Microbiol. Meth. 66(1): 116-124

Stratégie

Inoculation de *M. chelonae* (10⁶ UFC) dans des concentrats d'eau de surface

Comparaison des méthodes de lyse

Lyse enzymatique A = SDS + protéinase K + lysosyme [38]

Lyse mécanique B = ribolyse [39]

Lyse mécano-enzymatique A+B = SDS + protéinase K + lysosyme + ribolyse

Comparaison des méthodes de purification

Procédure CTAB/PCI C = hexadécyltriméthylammonium + phénol-chloroforme [40] **Procédure IRT**® D = technologie d'élimination d'inhibiteurs de PCR [41]

Paramètres de comparaison

Pureté de l'ADN = ration 260 nm / 280 nm

ADN total = mesure à 260 nm

ADN de M. chelonae ATCC 35752 = qPCR [35]

[40] Amaro, A. et al. (2008) Lett. Appl. Microbiol. 47(1):8-11

[41] Robeson, M. S. et al. (2009) BMC Ecol. 9(25):1-10

[35] Radomski N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(21): 7348-7351



Résultats

La méthode A+C a permis de récupérer le plus d'ADN total et le plus d'ADN mycobactérien

Conclusions

Perspectives

Méthode	d'extraction	Essais _	ADN total extrait		
Lyon Durification		augntifichtes	Ratio moyen de pureté	ADN moyen extrait	
Lyse	Purification	quantifiables	$(260nm/280nm \pm SD)$	$(\mu g/mI \pm SD)$	
А	С	6	$1,88 \pm 0,19$	318 ± 228	
А	D	1	2,66	20	
В	С	6	$1,91 \pm 0,15$	84 ± 44	
В	D	6	$1,77 \pm 0,04$	101 ± 41	
A+B	С	1	0,74	123	
A+B	D	5	$1,45 \pm 0,28$	14 ± 8	

Sources et comportements

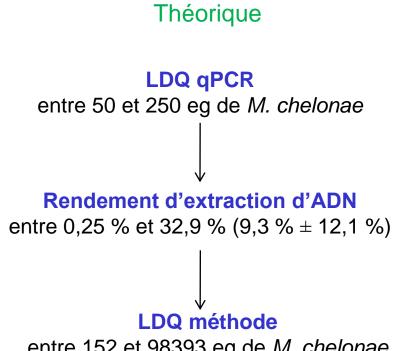
Pureté et récupération de l'ADN total (n=36)

Méthode	e d'extraction	Fssais		DNA mycobactérien extrait		
Lyse	Purification	quantifiables	essais quantifiables	Nombre de cycle seuil moven ± SD	Copies moyennes (log ₄₀ eg) ± SD	
А	С	6	10	$30,57 \pm 2,79$	$4,88 \pm 0,74$	
А	D	0	1	ND	ND	
В	С	0	1	ND	ND	
В	D	2	1	$33,98 \pm 2,99$	$4,02 \pm 0,77$	
A+B	С	6	1	$33,54 \pm 1,33$	$3,16 \pm 0,34$	
A+B	D	0	1	ND	ND	

ADN mycobactérien quantifié par qPCR (n=36)

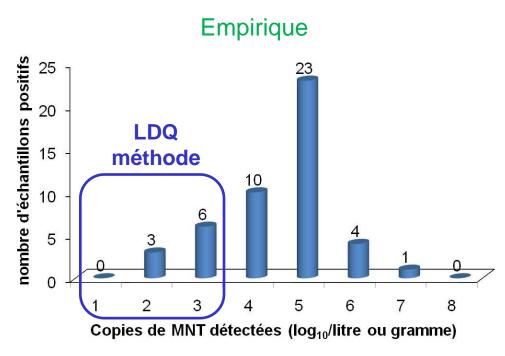


Limite de quantification (LDQ)



Choix de l'extraction d'ADN

entre 152 et 98393 eg de *M. chelonae* (entre **2,1 et 4,9 log₁₀ eg/L ou g**)



Distribution des échantillons quantifiables (19%) en fonction de la concentration en MNT quantifiée dans l'ensemble des prélèvements qui seront présentés (47 positifs sur 238)

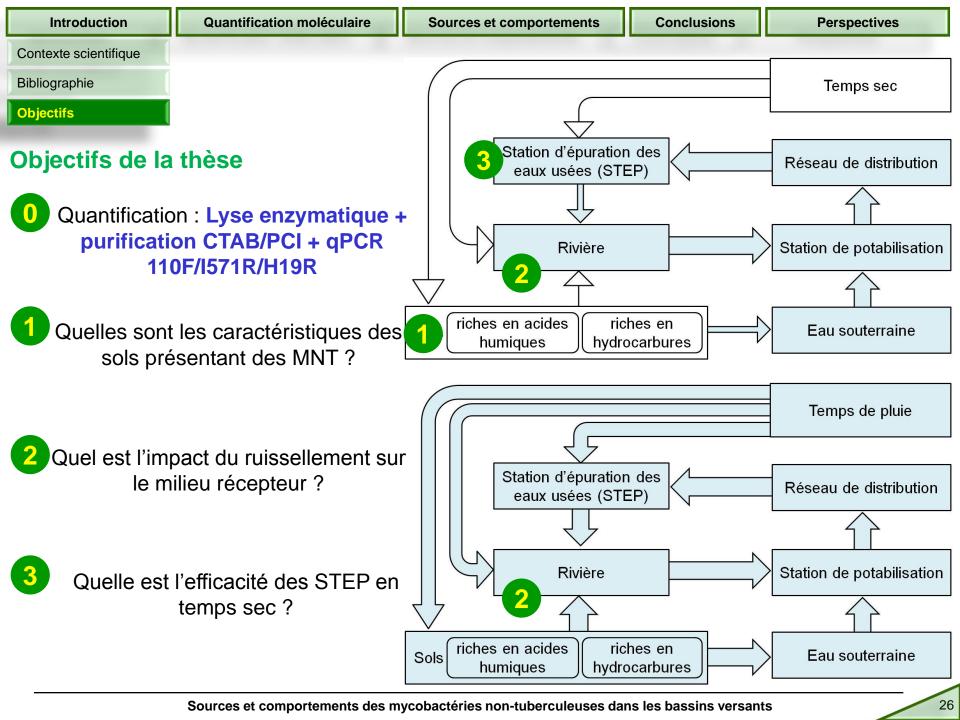


A retenir

Quelle que soit la méthode de lyse employée, la procédure IRT® permet de récupérer une faible quantité d'ADN mycobactérien très pur

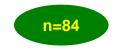
La lyse enzymatique (SDS + protéinase K + lysosyme) combinée à la procédure CTAB/PCI (hexadécyltriméthylammonium + phénol-chloroforme alcool isoamylique) a permis de récupérer le plus d'ADN mycobactérien tout en éliminant les inhibiteurs de PCR

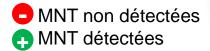
Application de la méthode d'extraction d'ADN sélectionnée suivi par la méthode qPCR développée [35] à des prélèvements de l'environnement



Introduction Quantification moléculaire Sources et comportements Conclusions Perspectives

Caractérisation des sols





Impact du ruissellement

Efficacité de STEP

Matériel et méthodes

Échantillonnage (saison tempérée en temps sec en 2010)

Zone	Pays	Coordonnées géographiques	
d'échantillonnage	ou état	Verticales	Horizontales
Forêt tourbeuse	Virginie de l'Ouest	38°12'03.10"N	80°16'05.33"O
Forêt de zone faiblement urbanisée	Virginie	37°13'14.90"N	80°24'58.28"O
Pâturage de bovins	Virginie	37°12'41.47"N	80°25'08.09"O
Parcelle de culture de maïs	Virginie	37°12'27.12"N	80°25'41.23"O
Espace vert de zone faiblement urbanisée	Virginie	37°13'59.44"N	80°25'12.59"O
Espace vert de zone fortement urbanisée	France	48°48'40.76"N	2°24'11.31"E
Zone faiblement urbanisée proche d'un marais côtier	Floride	26°19'23.03"N	81°50'31.93"O

Plan de prélèvement

Paramètres suivis

- Couleur - pH

- Humidité - Matière organique

- Carbone organique - Métaux :

- Conductivité Ag, Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb,

Zn (ICP-AES)

Quantification moléculaire

Sources et comportements

Conclusions

Perspectives



MNT non détectées
MNT détectées

Caractérisation des sols

Impact du ruissellement

Efficacité de STEP

Résultats

Détection / Quantification

L'habitat des MNT semble être des sols :

- acides

- proches de zones acides



Forêt tourbeuse $4.9 \pm 0.5 \log_{10} \text{ eg /g dw}$ (58 % des échantillons)



Zone faiblement urbanisée proche d'un marais côtier 4,8 ± 1,2 log₁₀ eg /g dw (58 % des échantillons)



Pâturage de bovins



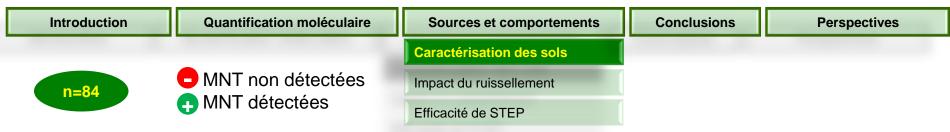
Parcelle de culture de maïs



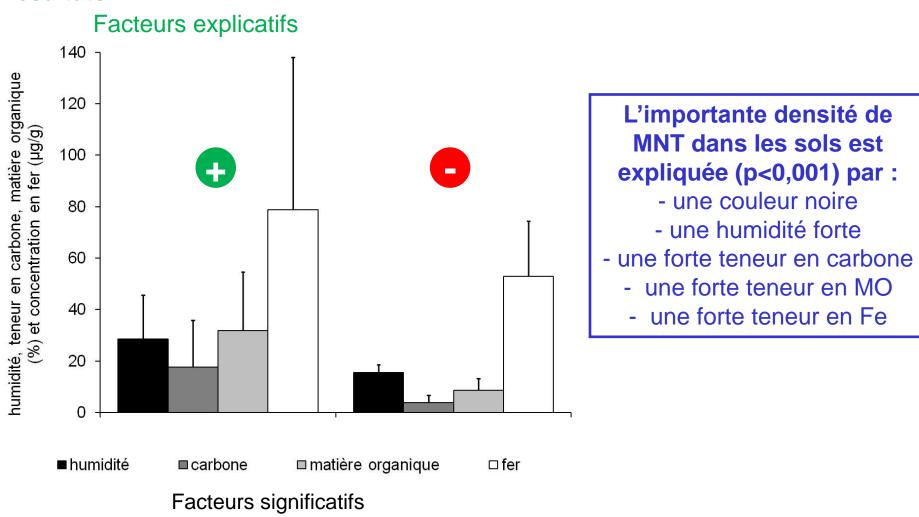
Forêts urbaines

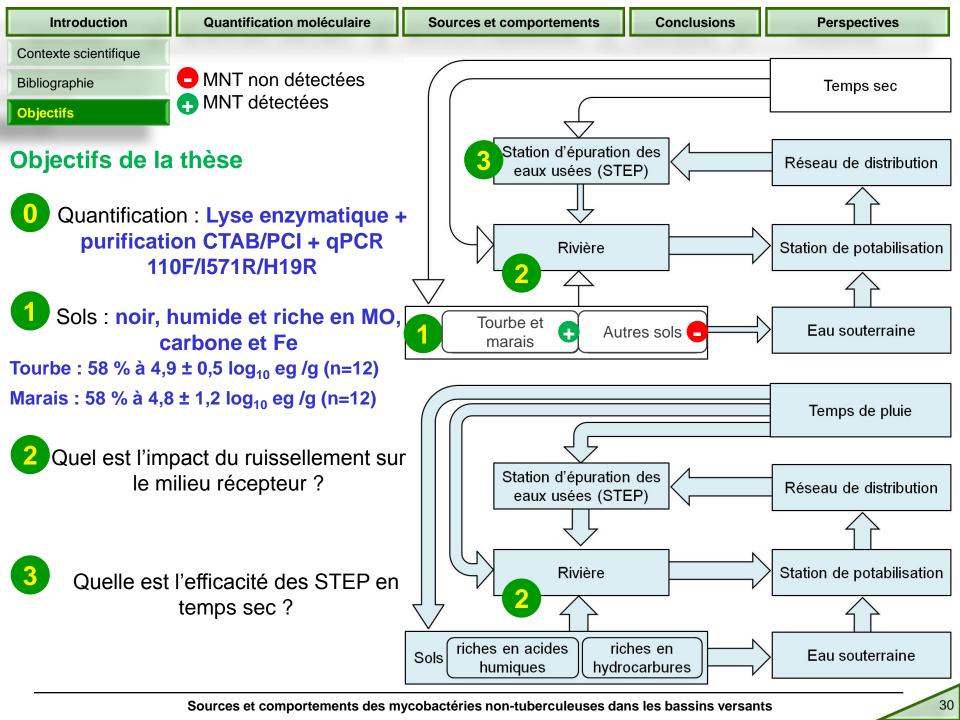


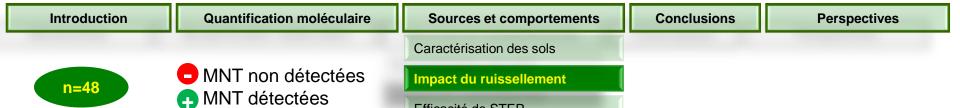
Espaces verts urbains



Résultats



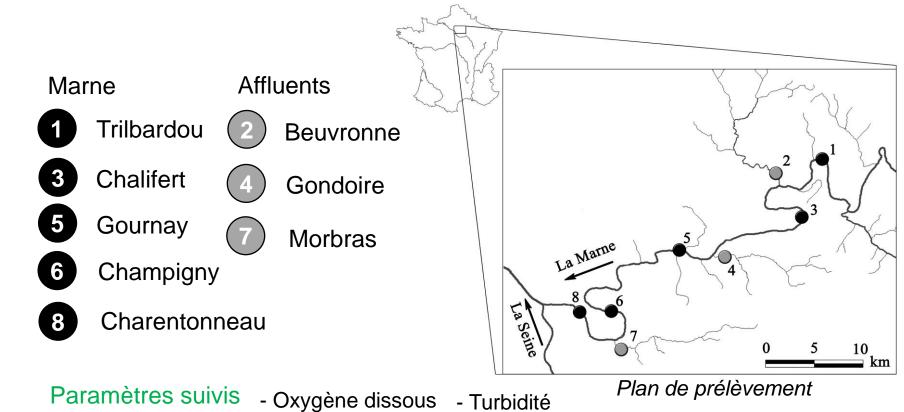




Efficacité de STEP

Matériel et méthodes

Echantillonnage (pendant l'événement pluvieux : 5-6/10/2009)



- Conductivité

- Pluviométrie

- pH

- Température



Efficacité de STEP

Résultats

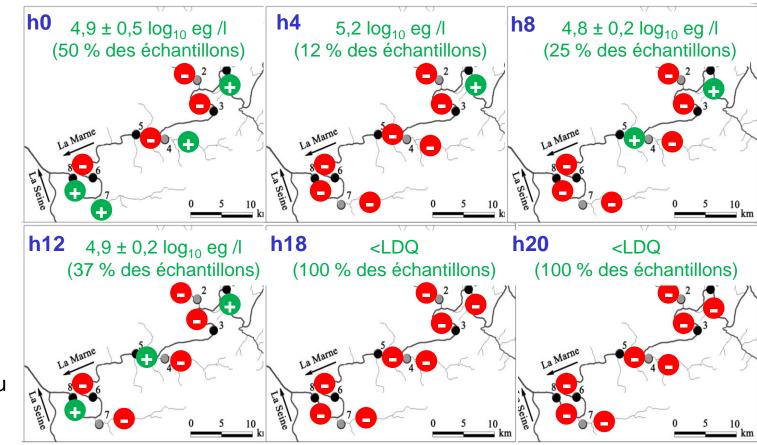
n=48

Détection / Quantification

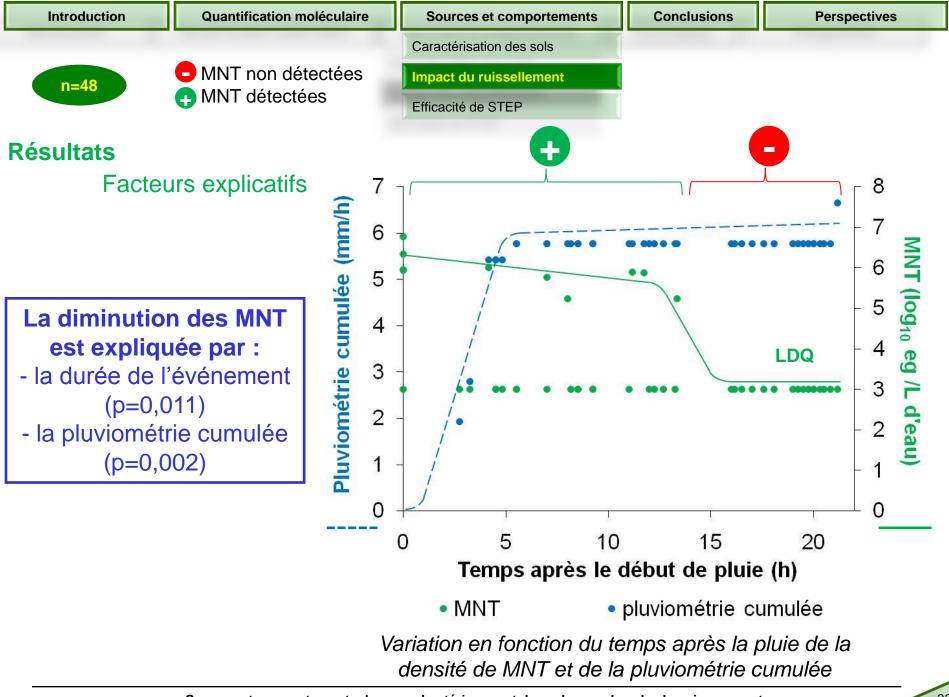
MNT détectées

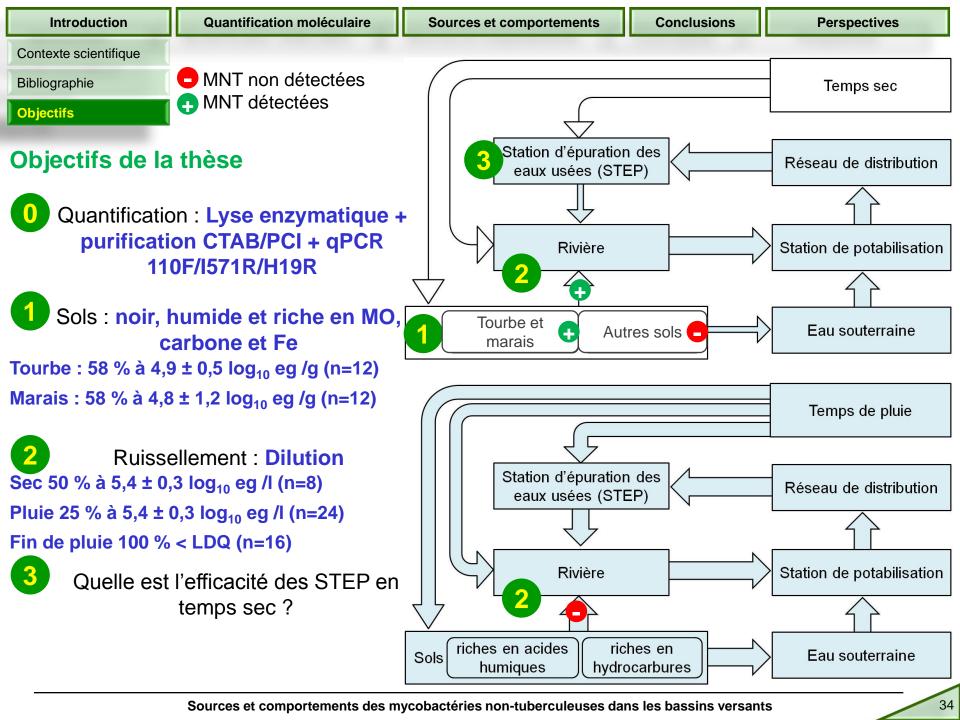
- Amont de la Marne contaminé jusqu'à 12h
- Origines non déterminées d'apports à 8h et 12h

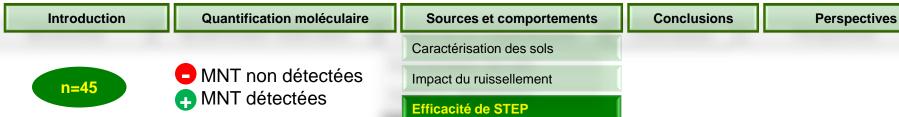
- 1 Trilbardou
- 2 Beuvronne
- 3 Chalifert
- 4 Gondoire
- 5 Gournay
- 6 Champigny
- 7 Morbras
- 8 Charentonneau



Quantification des MNT pendant un événement pluvial





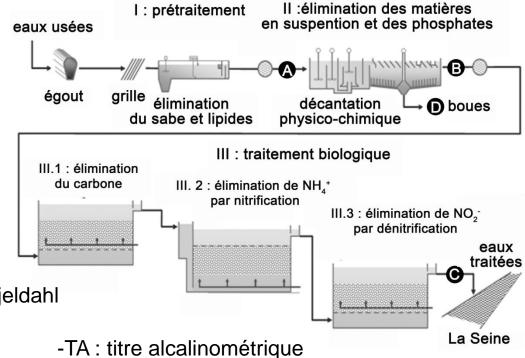


Echantillonnage (Seine Centre : de 2008 à 2009)

- Eau pré-traitée
- Décantation physico-chimique
- C **Biofiltration**
- Boue de décantation D Physico-chimique

Paramètres suivis

- CT : Cellules totales NTK : azote total Kjeldahl
- EN : Escherichia coli- NH₄+ : ammonium
- EI: Enterococcus
 - NO₃⁻: nitrates
 - NO₂⁻: nitrites
 - PO₄³⁻: orthophosphates DCOt: demande chimique en oxygène (totale)
 - pH
 - T : température



- DCOs : demande chimique en oxygène (soluble)

- DBO₅ : demande biologique en oxygène

- MES : matières en suspension



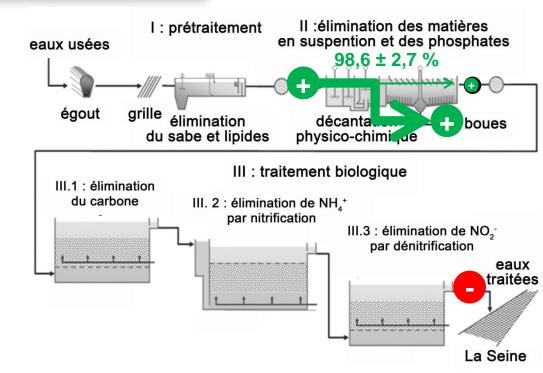
- MNT non détectéesMNT détectées
- Caractérisation des sols
 Impact du ruissellement

 Efficacité de STEP

Résultats

Détection / Quantification

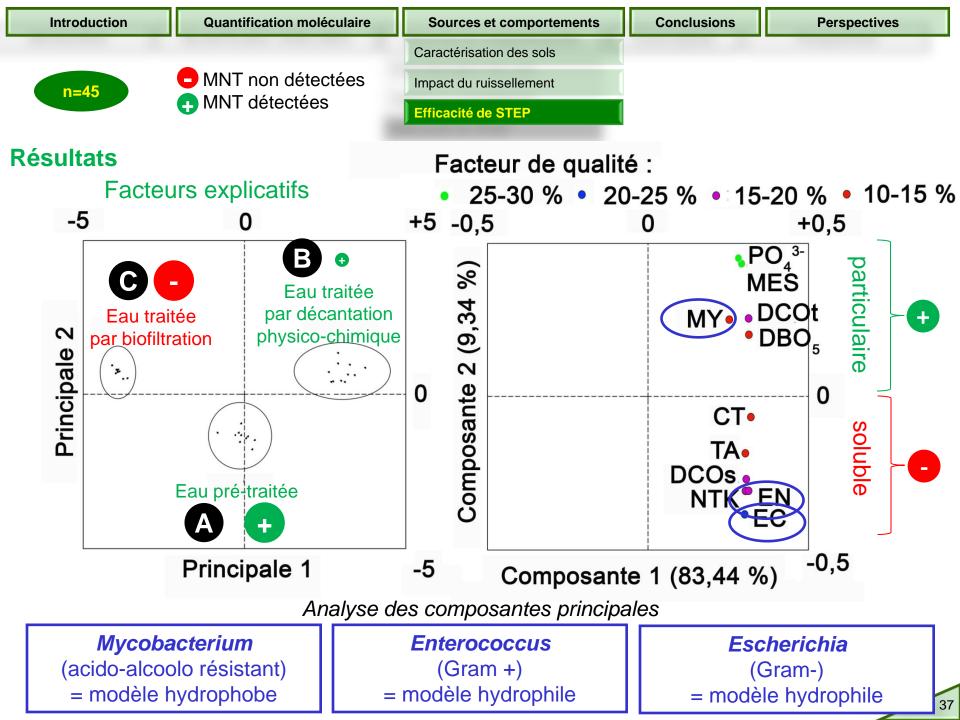
- $5.6 \pm 0.4 \log_{10} \text{ eg /l}$ (84 % des échantillons)
- Non détecté (<LDQ)
- $5.1 \pm 1.1 \log_{10} \text{ eg /g}$ (50 % des échantillons)

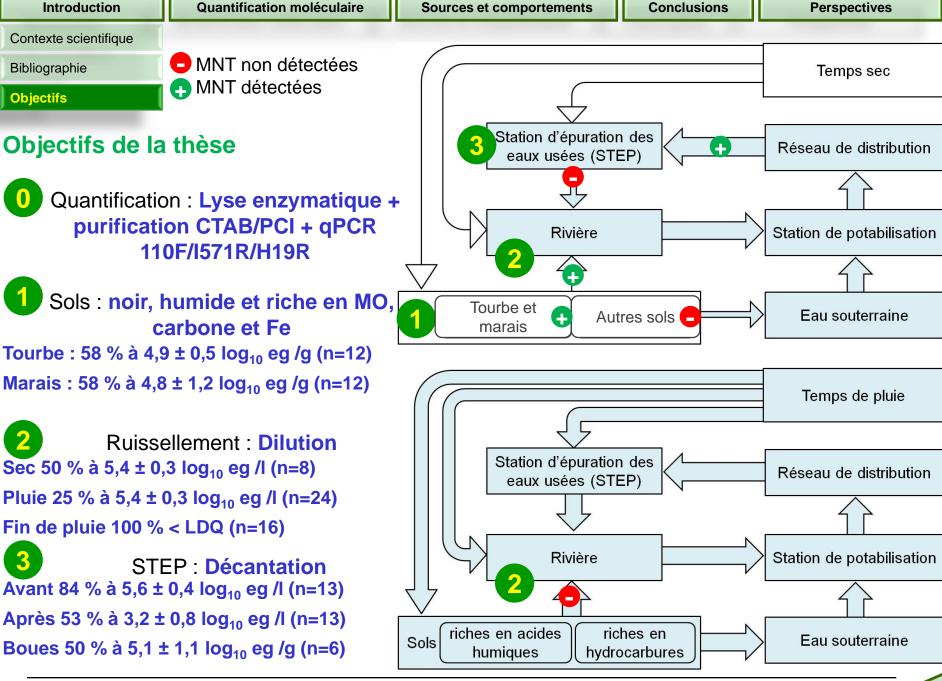


Elimination des MNT en STEP

Les MNT sont:

 éliminées majoritairement par décantation physico-chimique
 non détectées dans le rejet de STEP





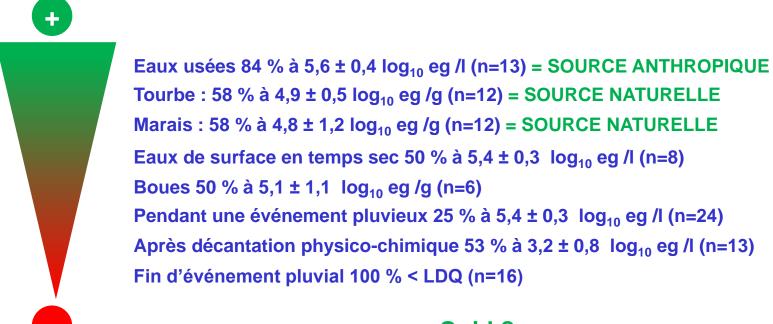
Introduction Quantification moléculaire Sources et comportements Conclusions Perspectives

Sources

MNT non détectées
MNT détectées

Sources
Comportements
Traitements

Hiérarchisation des sources potentielles



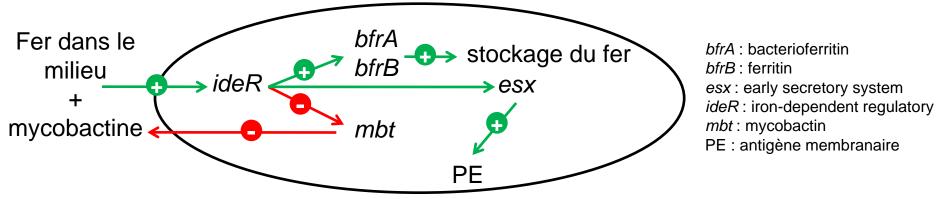
Quid?

- Impact des événements pluvieux intenses
- Impact de l'épandage de boues de STEP
- Origine des MNT de l'eau de surface non impactées par les sols acides



MNT = Auxotrophe au fer

production de siderophores intra et extracellulaires, comme l'exochéline ou la mycobactine, leurs permet d'incorporer le fer de l'environnement [42, 43]
 existence d'un relation entre gestion du fer et virulence [44]



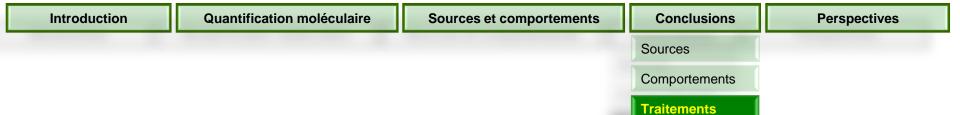
Régulation du fer des mycobactéries : Rôle dans la physiologie et la virulence [45]

Quid du métabolisme du fer chez d'autres microorganismes pathogènes de l'environnement ?

[42] Barclay, R., and C. Ratledge (1983) J. Bacteriol. 153(3):1138-1146

[43] Chan, K.G. (2009) Int. J. Mol. Sci. 10(1):345-353

[44] Marcela Rodriguez, G. and I. Smith (2003) Mol. Microbiol. 47(6): 1485–1494



Le caractère hydrophobe des MNT rend le traitement de décantation physico-chimique des STEP efficace

Jusqu'à présent seulement deux études rapportées la présence de MNT dans les eaux usées [45] et les boues de STEP [46]

MNT = Modèle bactérien hydrophobe

- adsorption préférentielle à l'interphase eau / air ou eau / surface [47]
 - comportement semblable à la matière organique [47]

Quid?

- Traitement des eaux usées en temps de pluie
- Traitement des eaux usées sans floculation
- Indicateur microbiologie des MNT

Constats

Les méthodes de détection par PCR des mycobactéries sont basées sur le polymorphisme de gènes de ménage historiquement utilisés pour les identifier, et sont donc spécifiques mais peu sensibles, ou a contrario, sensibles mais peu spécifiques

Depuis la description du premier génome mycobactérien en 1998 (*M. tuberculosis* H37Rv) la quantité de **génomes mycobactériens** séquencés n'a **cessé d'augmenter** grâce à l'avènement du **séquençage à haut-débit**

Objectif

Comparer des génomes mycobactériens et non-mycobactériens, afin de définir des cibles protéigues ou moléculaires exclusivement conservées chez les mycobactéries

Matériel et méthode

Introduction

Génomes comparées à la référence M. tuberculosis H37Rv

Intérêt sanitaire
Remerciements

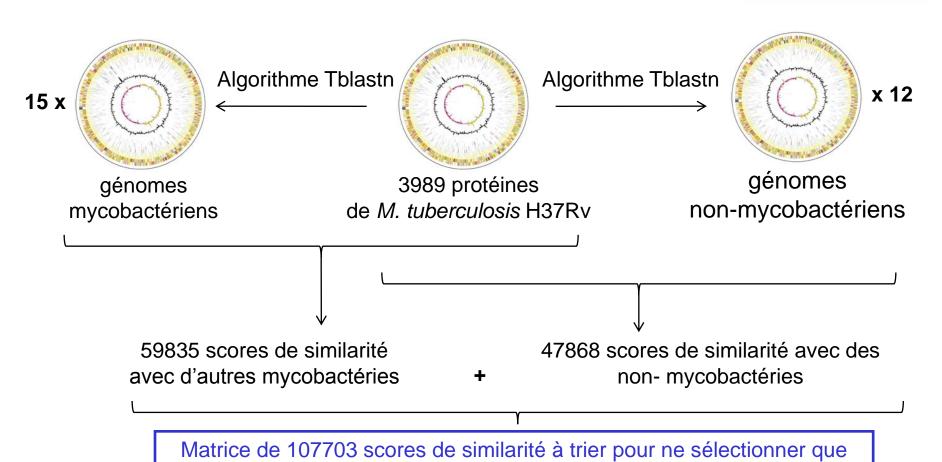
15 génomes mycobactériens

- M. abscessus ATCC 19977 (CU458896.1)
- M. avium 104 (CP000479.1)
- *M. bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 (BX248333.1)
- M. gilvum PYR-GCK (CP000656.1)
- M. marinum M (CP000854.1)
- M. smegmatis MC2 155 (CP000480.1)
- M. sp. JLS (CP000580.1)
- M. sp. KMS (CP000518.1)
- M. sp. MCS (CP000384.1)
- M. tuberculosis CDC1551 (AE000516.2)
- M. tuberculosis H37Ra (CP000611.1)
- M. tuberculosis KZN 1435 (CP001658.1)
- M. ulcerans Agy99 (CP000325.1)
- M. vanbaalenii PYR-1 (CP000511.1)

12 génomes non-mycobactériens

- C. aurimucosum ATCC 700975 (CP001601.1)
- C. diphtheriae NCTC 13129 (BX248353.1)
- M. avium subsp. paratuberculosis K10 (AE016958.1)C. efficiens YS-314 (BA000035.2)
 - C. glutamicum ATCC 13032 (BX927147.1)
 - C. jeikeium K411 (NC_007164)
 - C. kroppenstedtii DSM 44385 (CP001620.1)
 - C. urealyticum DSM 7109 (AM942444.1)
 - N. farcinica IFM 10152 (AP006618.1)
 - Nocardioides sp. JS614 (CP000509.1)
 - R. erythropolis PR4 (AP008957.1)
 - R. jostii RHA1 (CP000431.1)
 - R. opacus B4 (AP011115.1)

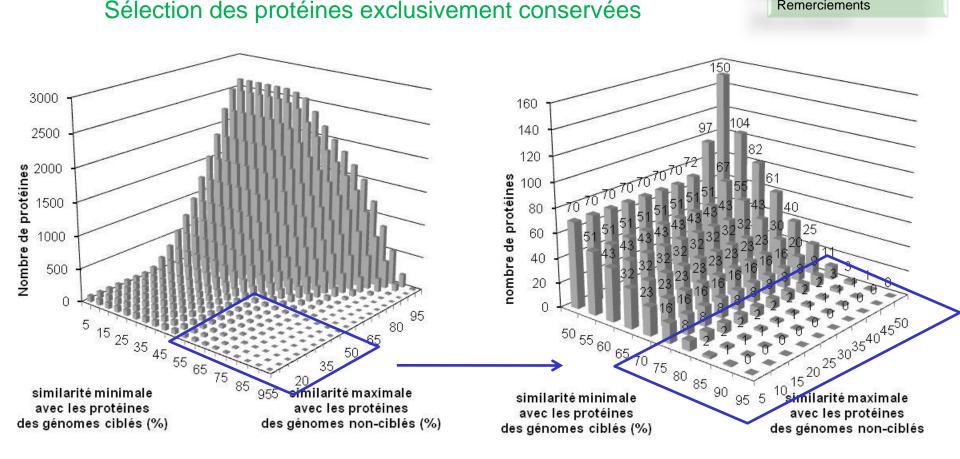
Comparaisons par le logiciel MycoHit version 14.17 [2]



cibles conservées exclusivement chez *Mycobacterium* spp.

Remerciements





11 protéines de *M. tuberculosis* H37Rv présentant plus de 80 % de similarité avec des protéines des génomes d'autres mycobactéries et moins de 50% de similarité avec des protéines des génomes non-mycobactériens

Introduction Quantification moléculaire Sources et comportements Conclusions Perspectives

Résultats

	Génomique
ats	Intérêt sanitaire
Protéines exclusivement conservées	Remerciements

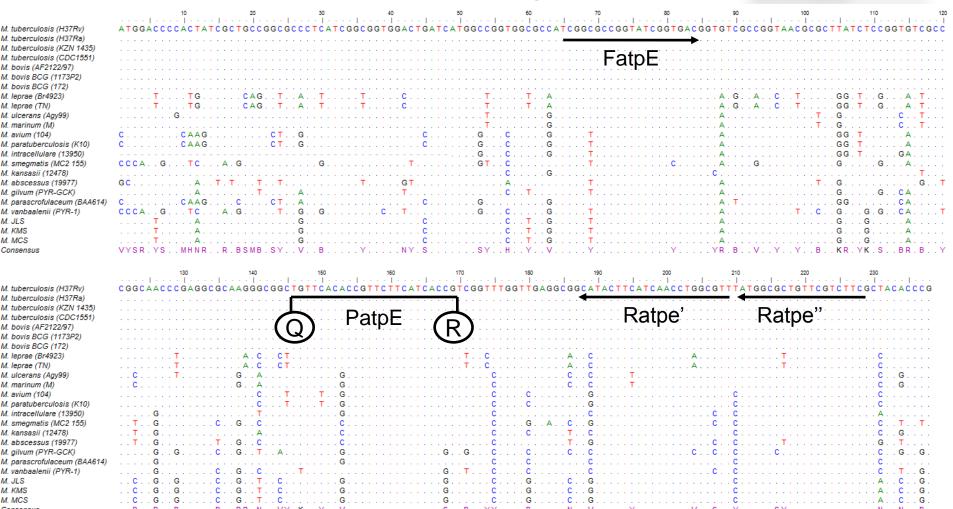
Locus (<i>M. tuberculosis</i>	Taille (pb)	protéine	gène
H37Rv)		Protéines très conservées	Gène très conservé
Rv1305	81	sous-unité C de l'ATPase	atpE
Rv0236A	57	protéine de sécrétion	
Rv0197	762	oxydoréductase	-
Rv2172	301	lipoprotéine M	lppM
Rv0287	97	système de sécrétion rapide	esxG
Rv0288	96	système de sécrétion rapide	esxH
Rv3019c	96	système de sécrétion rapide	esxR
Rv0285	102	PE5	-
Rv3022c	81	PPE48	-
Rv1304	250	sous-unité A de l'ATPase	atpB
Rv3392	287	cyclopropane mycolic acid synthase	cmaA1

Protéines et gènes très conservés dans les MTC, mais moins chez les MNT

Protéines de *M. tuberculosis* H37Rv présentant plus de 80 % de similarité avec des protéines des génomes d'autres mycobactéries et moins de 50% de similarité avec des protéines des génomes non-mycobactériens

Résultats

Dessin d'une sonde et d'amorces sur le gène atpE



Remerciements

Conclusions

Perspectives

Comparaison de génomes

Intérêt sanitaire

Remerciements

Plusieurs espèces présentes non détectables par qPCR

M. chelonae M. insubricum M. porcinum M. arupense M. austroafricanum M. llatzerense M. psychrotolerans M. setense

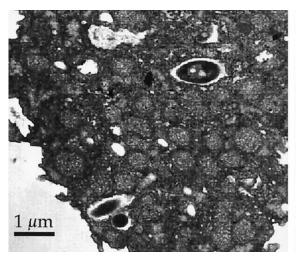
Espèce de MNT isolées de l'eau de surface par bactériologie [24]

M. arupense M. nonchromogenicum M. gadium M. psychrotolerans M. lentiflavum M. szulgai M. tusciae

Espèce de MNT non détectées par la méthode qPCR développée [35]

Résistance dans les amibes

Introduction



Microscopie électronique de M. avium dans Acanthamoeba castellanii [49]

[24] Radomski, N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(11): 3514-3520

[35] Radomski N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(21): 7348-7351

[49] Cirillo, J.D. et al. (1997) Infect. Immun. 65(9) 3759-3767

Protection et gestion de l'eau

Introduction



Directive-cadre sur l'eau (2000/60/CE)

= objectifs de préservation et restauration de l'eau de surface et de l'eau souterraine d'ici 2015

Objectifs de bon état chimique des eaux souterraines et de surface (Décision N° 2455/2001/CE)

- = Atteindre un bonne état chimique en :
 - réduisant la concentration de 33 substances prioritaires à seuil réglementaire
 - éliminant 25 substances dangereuses prioritaires à seuil réglementaire

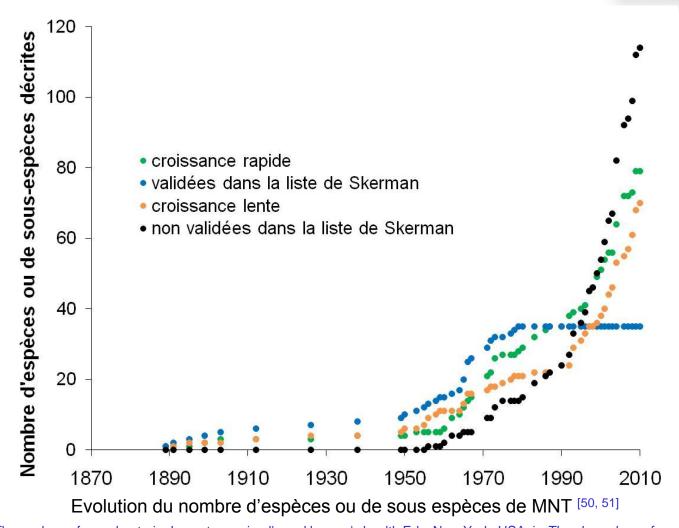
Objectifs de bon état écologique des écosystèmes aquatiques associés aux eaux de **surface** (Annexe V Directive 2000/60/CE)

- = Atteindre un bonne état écologique en contrôlant la composition, l'abondance et la biomasse :
 - du phytoplancton
 - de la flore aquatique autre que le phytoplancton
 - de la faune benthique invertébrée
 - de l'ichtyofaune

Les bactéries, comme les pathogènes environnementaux, ne sont pas pris en compte

Existe-t-il des dérives dans la caractérisation moléculaire ?

Introduction



[50] Kazda J. (2009) The ecology of mycobacteria: Impact on animal's and human's health Eds. New York, USA, in *The chronology of mycobacteria* [51] Skerman V.B.D. (1989) Approved lists of bacterial names. A. edition Eds. Washington (DC), USA, in *American Society of Microbiology Press*

Quantification moléculaire

Sources et comportements

Conclusions

Perspectives

Aides techniques aux laboratoires d'accueil

Intérêt sanitaire

Comparaison de génomes

Remerciements



Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains

Catherine Lorgeoux et Lila Boudahmane (carbone)
Catherine Charleux, Annick Piazza et Patricia Cambergs (administration)
Yacine Boudali (comparaison extraction ADN)
Laetitia Betelli (indicateurs fécaux)



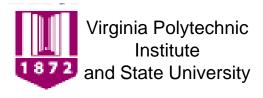
Direction Recherche et Développement Qualité Eau

Fanny Richard (aides multiples au laboratoire)
Héberte Accrombessi (travaux in vitro atpE)
Sophie Haenn (maintenance du séquenceur et commandes bio. mol.)
Nicole Buet, Uthaya Sivanantham et Emile Ducarme (injection extraction métaux)



Hôpital Charles Foix et Hôpital de la Pitié-Salpêtrière

Salak Gallah et Marie-Noël Gamard (commandes en bactério.) Claudine Wichlaz (conservation mycobactéries de référence)



Justin Tanner, Krista Williams, Amy Pruden et Myra Williams (aides multiples au laboratoire)

Aides techniques extérieures





l'Assainissement Francilien

Vincent Rocher, Alexandre Gonçalves, Céline Briand, Sabrina Rechdaoui, laboratoire de chimie (prélèvements et paramètres chimique en STEP)



Ensembles des équipes (organisation et participation aux campagnes de prélèvement et aux mesures *in situ*)

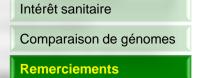


Frédéric Veyrier et Marcel Behr (liaison des logiciels de comparaison de génomes)



Jacques Printems (emprunt de calculateur)

Aides financières (directeurs et financeurs des programmes)





Philippe Courtier et Bruno Tassin (financement du salaire)



Jean-Marie Mouchel, Ghassan Chebbo et Michel Joyeux

(financement des recherches)



Bernard Lapeyre, Denis Duhamel, Catherine Alcouffe et Marine Daniel (financement de la mobilité international) Quantification moléculaire Sources et comportements

Conclusions

Perspectives

Intérêt sanitaire

Comparaison de génomes

Remerciements

Aides scientifiques

Introduction

Encadrement Collègue du monitorat

Régis Moilleron Françoise Odelin

Françoise S. Lucas Cécile Rousseau

Laurent Moulin Olivier Bezier

Emmanuelle Cambau Daniel Thévenot

Comité de thèse Collaborateurs

Vincent Rocher Johnny Gasperi

Vincent Jarlier Maria Laura Boschiroli

Yves Levi Franck Biet

Jean-Marie Mouchel Joseph O. Falkinham III

Maria Laura Boschiroli Patrick Boiron

Veronica Rodriguez-Nava

Françoise Irlinger

Rapporteurs de thèse et l'ensemble du jury

Benoit Cournoyer Christophe Sola

Introduction	Quantification moléculaire	Sources et comportements	Conclusions	Perspectives
Contexte scientifique	Développement qPCR	Caractérisation des sols	Sources	Comparaison de génomes
Bibliographie	Validation qPCR	Impact du ruissellement	Comportements	Intérêt sanitaire
Objectifs	Choix de l'extraction d'ADN	Efficacité de STEP	Traitements	Remerciements







Soutenance de thèse de doctorat Sciences et Techniques de l'Environnement

Nicolas RADOMSKI



Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains Données supplémentaires

Propriétés tinctoriales

Méthodes de culture

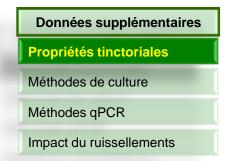
Méthodes qPCR

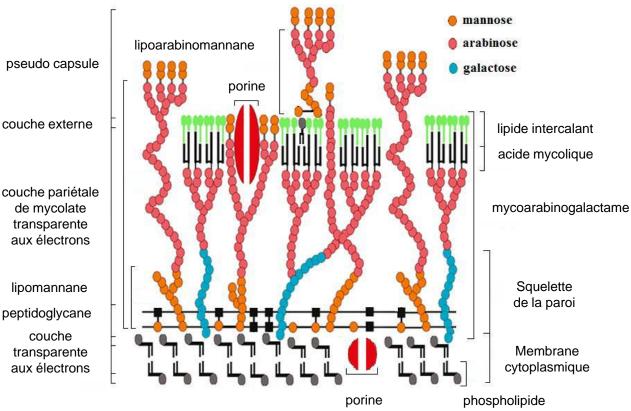
Impact du ruissellements

Sources des mycobactéries non-tuberculeuses (MNT)
dans les bassins versants

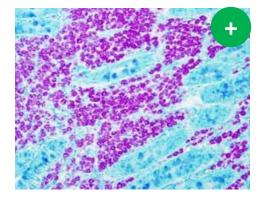


Observatoire des Polluants Urbains en Ile-de-France Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine





Paroi mycobactérienne [52, 53]



Bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) détectés par coloration de Ziehl-Neelsen dans l'iléon terminal (échelle microscopique x 250) [54]

[52] Alsteens D. et al. (2008). Eur. J. Physiol. 456(1): 117-125

[53] Verbelen C.. et al. (2009). Langmuir Lett. 25(8): 4324-4327

[54] Smeed J.A.. et al. (2007). BMC Vet. Res. 18(3): 1-11

Matériel et méthodes

Facteurs comparés [24]





concentrat



Middlebrook 7H11_i

Les Méthodes de décontamination chimique

Löwenstein: H₂SO₄+NaOH

Petroff: NaOH+HCI

Tacquet-Tison: SDS-NaOH+H₃PO₄ Kubica: NaOH-NALC+tampon NaKPO₄

Acide oxalique (COOH)₂+NaOH

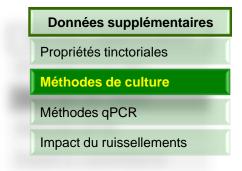
Cetylpyridininium Chloride (CPC) +H₂O

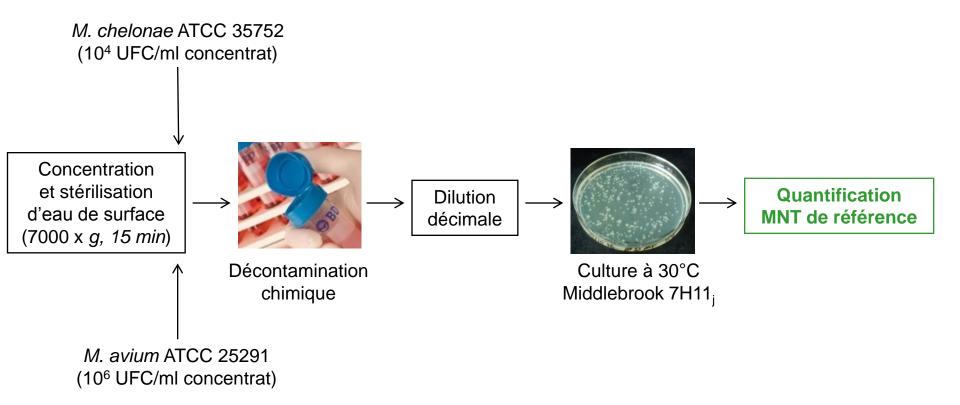
Antibiotiques PANTA ou PANTAV dans le milieu de culture

Polymyxine B Amphotéricine Acide nalidixique Triméthoprime Carboxy-pénicilline Vancomycine

Matériel et méthodes

Impact sur des MNT de référence [24]





Matériel et méthodes

Impact sur les microorganismes interférents (MI) [24]

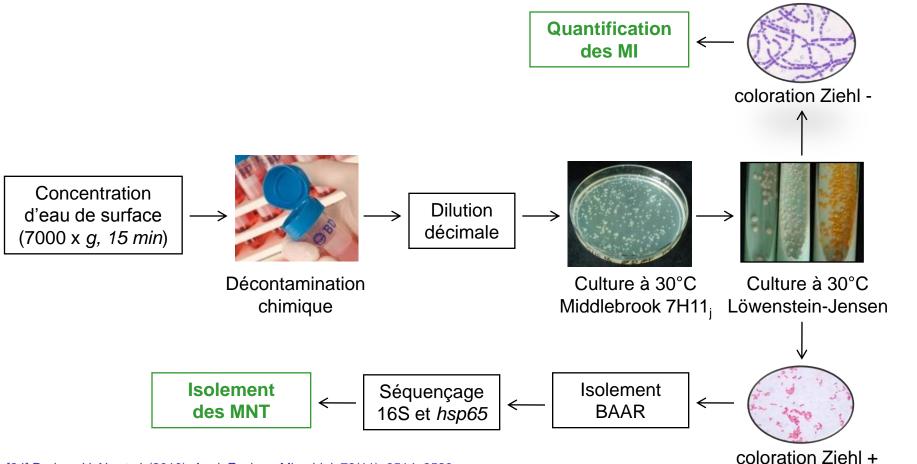
Données supplémentaires

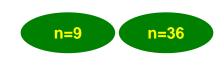
Propriétés tinctoriales

Méthodes de culture

Méthodes qPCR

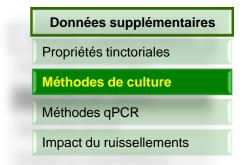
Impact du ruissellements

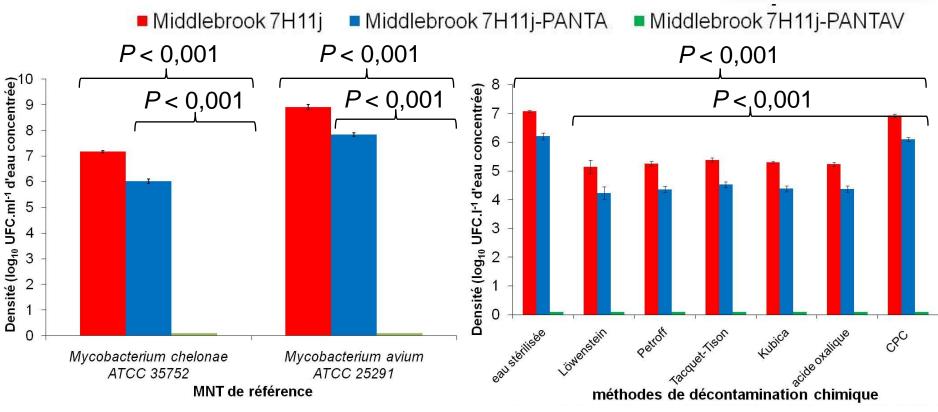




Résultats

Impact sur des MNT de référence [24]





Densité de *M. chelonae* et *M. avium* sur du milieu Middlebrook 7H11_j sans antibiotiques, avec du PANTA et avec du PANTAV

Densité de *M. chelonae* sur du milieu Middlebrook 7H11_j après décontamination chimique préalable (21ème jour d'incubation à +30°C)
Conclusions identiques pour *M. avium*

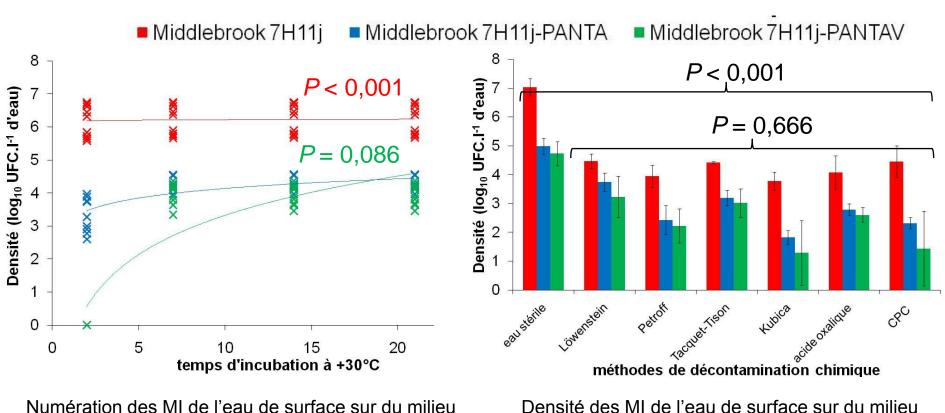
[24] Radomski, N. et al. (2010). Appl. Environ. Microbiol. 76(11): 3514–3520



Résultats

Impact sur les microorganismes interférents (MI) [24]





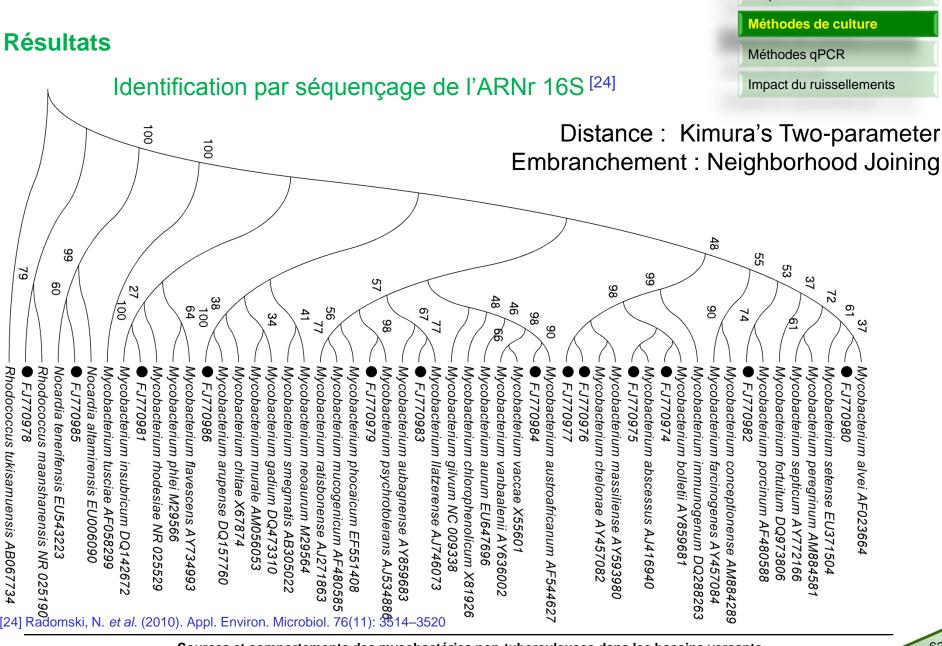
ét avec du PANTAV

Densité des MI de l'eau de surface sur du milieu Middlebrook 7H11_j après décontamination chimique préalable (21ème jour d'incubation à +30°C)

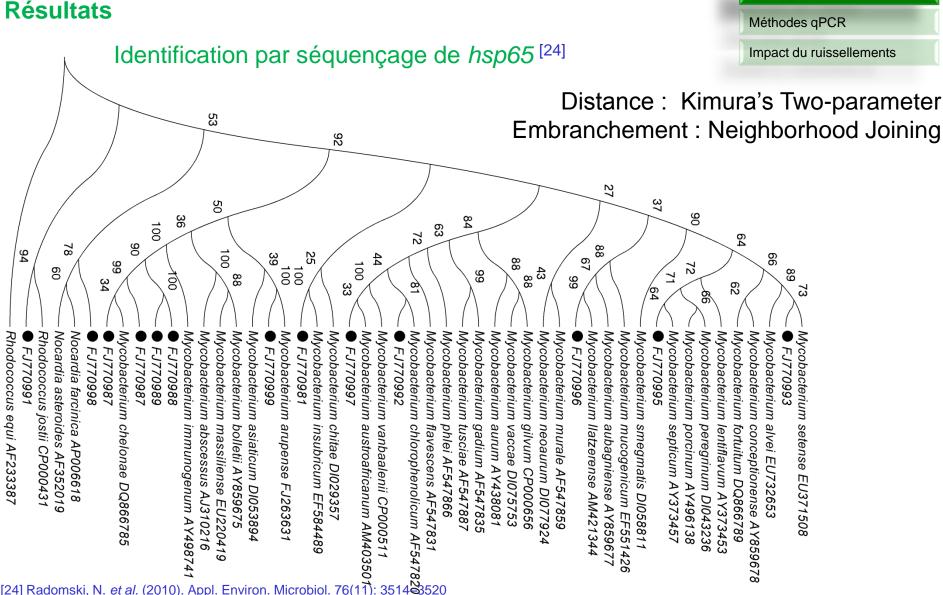
Middlebrook 7H11; sans antibiotiques, avec du PANTA

61

Données supplémentaires Propriétés tinctoriales Méthodes de culture Méthodes qPCR Impact du ruissellements



Données supplémentaires Propriétés tinctoriales Méthodes de culture Méthodes qPCR Identification par séquençage de hsp65 [24] Impact du ruissellements



[24] Radomski, N. et al. (2010). Appl. Environ. Microbiol. 76(11):





La décontamination CPC est la moins létale pour les MNT, et diminue significativement les MI comme les autres méthodes de décontamination chimique

Les antibiotiques PANTA diminuent significativement les MI, et sont peu létales pour les MNT contrairement aux antibiotiques PANTAV

Des espèces de MNT potentiellement pathogènes sont isolables de la Seine, mais ne peuvent être quantifiées par bactériologie



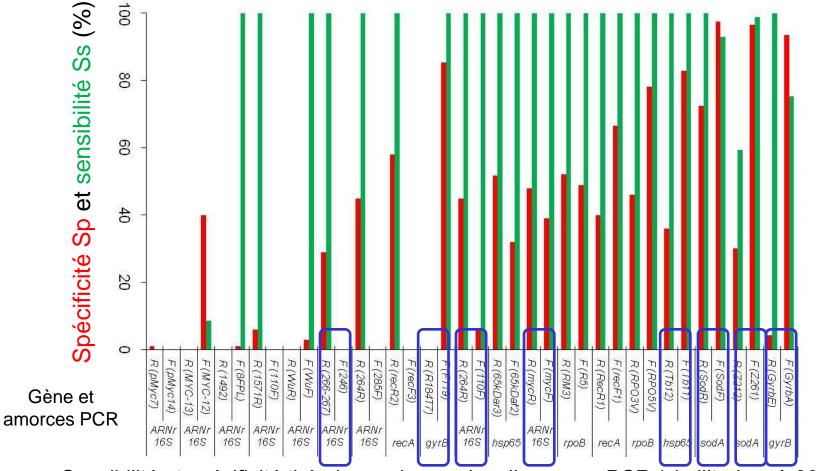
Amorces PCR retenues par l'analyse in silico

Données supplémentaires Propriétés tinctoriales Méthodes de culture Méthodes qPCR

Impact du ruissellements

Résultats

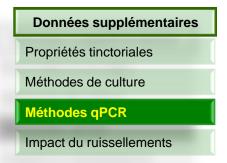
Evaluation *in silico* de la spécificité et de la sensibilité de 19 amorces PCR



Sensibilité et spécificité théoriques de couples d'amorces PCR (similitude > à 90 %)



Perte d'efficacité et de linéarité avec la B-HN



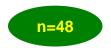
Résultats

Influence de la balanced heminested qPCR (B-HN qPCR) [35]

Paramètre	sans B-HN qPCR	avec B-HN qPCR
	(non optimisée) [35]	[36]
E (%)	68,47±1,53	58,71±15,95
r² (%)	96,66±0,01	74,76±0,04
LQ (fg)]1731; 8656] fg]346; 1731] fg
LQ (eg)]393; 1967] eg]79; 393] eg
Ct max	34,82±1.0	15,51±3,23

Comparaison de l'efficacité (E), du coefficient de corrélation (r²) et de la limite de quantification (LQ) des qPCR avec ou sans balanced heminested (B-HN)

[35] Radomski N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(21): 7348-7351 [36] Garcia-Quintanilla, A. et al. (2000) J. Clin. Microbiol. 38(3): 1166-1169

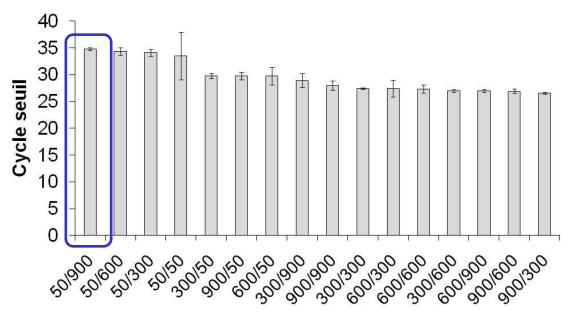


Concentration en ration d'amorces 110F/I571R sélectionnée : 50/900 nM



Résultats

Optimisation de la qPCR [36]



Ratio de la concentration en amores 110F (nM) / I571R (nM)

Evolution du cycle seuil en fonction du ratio de concentration en amorce



Concentration en sonde sélectionnés : 50 nM

Concentration en MgCl₂ sélectionnés : 5 mM



Optimisation de la qPCR [36]

[H19R] (nM)	50	100	250
E (%)	65,49	63,20	66,61
r2 (%)	99,35	98,98	99,04
Ct max	$39,02 \pm 0,57$	$39,\!00\pm0,\!77$	$38,38\pm0.40$

Evolution de l'efficacité (E), du coefficient de régression (r²) et du cycle seuil de la limite de quantification (Ct max) en fonction de la concentration en amorce H19R

[MgCl2] (mM)	5	6	7	8
E (%)	76,26	77,12	99,74	0
r2 (%)	99,43	96,13	86,70	ND
Ct max	$39,02 \pm 0,57$	$39,00 \pm 0,77$	$38,38\pm0,40$	0

Evolution de l'efficacité (E), du coefficient de régression (r²) et du cycle seuil de la limite de quantification (Ct max) en fonction de la concentration en MgCl₂

[36] Radomski N. et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76(21): 7348-7351

