

Développement de méthodes de quantification des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau de la Seine

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

¹ Cereve, Ecole National des ponts et chaussées, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité
Descartes, 77455 Champs sur marne : nicolas.radomski@cereve.enpc.fr

² Cereve, Université Paris 12-Val de Marne, 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, Hospital Saint-Louis,
75010 Paris : emmanuelle.cambau@sls.aphp.fr

⁴ Crecep, Etude biologie, 144 avenue Paul Vaillant Couturier, 75014 Paris :
laurent.moulin@crecep.fr, sophie.haenn@crecep.fr

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

1	Les mycobactéries non tuberculeuses	2
1.1	Caractéristiques	2
1.2	Incidence chez l'homme liée à l'eau	4
1.3	Occurrence dans l'eau	5
1.4	Les espèces d'intérêt dans l'eau	6
2	Harmonisation des méthodes de quantification par bactériologie	8
2.1	Contexte.....	8
2.2	Matériel et méthode.....	9
2.1	Résultats et discussion.....	11
3	Développement d'une méthode de quantification par biologie moléculaire	19
3.1	Contexte.....	19
3.2	Matériel et méthode.....	19
3.3	Résultats et discussion.....	22
4	Perspectives.....	25
4.1	Bactériologie	25
4.2	Biologie Moléculaire.....	25

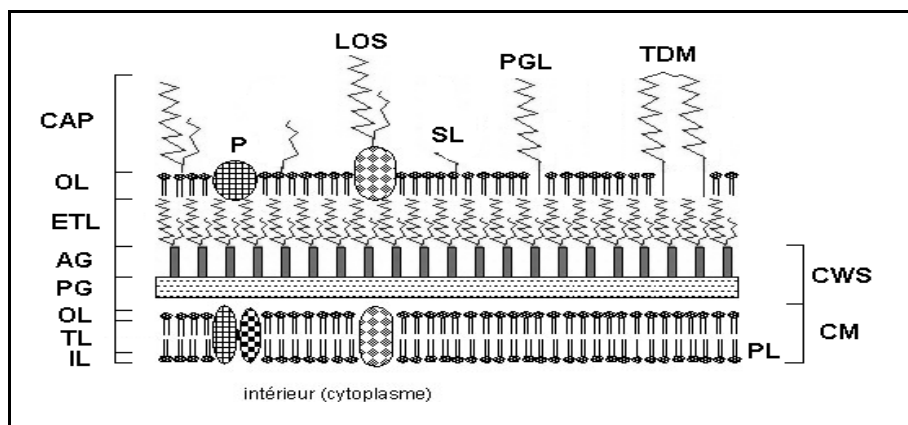
Les mycobactéries non tuberculeuses sont reconnues comme pathogène émergents depuis 2004 par l'Organisation Mondiale de la Santé. Ces pathogènes pour l'homme sont à l'origine d'infections diverses d'origine aqueuse. Or leur cycle dans l'eau est mal connu et il n'existe pas actuellement de méthode de quantification adaptées aux environnements aquatiques. Ainsi, cette année il a été entrepris de se baser sur les connaissances que l'on a de ces pathogènes (§1), afin de développer une méthode de quantification en milieu aqueux par bactériologie (§2) et par biologie moléculaire (§3). La méthode de bactériologies longue et complexe va permettre d'identifier les espèces de mycobactéries non tuberculeuses du bassin versant de la Seine, et la méthode de biologie moléculaire va permettre de quantifier rapidement et de façon exhaustive le genre *Mycobacterium* en général.

1 Les mycobactéries non tuberculeuses

1.1 Caractéristiques

1.1.1 Morphologie

Les MYC (mycobactéries) sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, répondants positivement à la coloration de Gram. Ces bacilles possèdent une catalase et ont un système respiratoire aérobie strict. Les MYC se caractérisent des autres familles de bactéries par leur acido-alcool-résistance. Cette résistance des MYC aux agents acido-basiques et alcooliques, est due à la composition en acides gras de leur paroi (Figure 1). Cette caractéristique permet de les identifier par coloration de Ziehl-Neelsen ou Ziehl-Armand, qui consiste à colorer ces bacilles par de la fuchsine, et les décolorer par de l'acide nitrique, puis par de l'alcool 96°. Une contre-coloration par le bleu de méthylène phéniqué est réalisée pour colorer les autres bactéries en bleu. Dans ces conditions les mycobactéries ne se décolorent pas, et apparaissent roses, car la fuchsine a la propriété de se fixer à l'acide mycolique et les cires de mycolate d'arabinogalactane, qui s'opposent à la pénétration des décolorants.



AG : arabinogalactane ; CAP : capsule ; CM : membrane cytoplasmique ; CWS : squelette de la paroi ; ETL : couche pariétale de mycolate transparente aux électrons ; IL : couche interne ; LOS : lipopolysaccharide ; OL : couche externe ; P : porine ; PG : peptidoglycane ; PGL : phénolglycolipide ; PL : phospholipide ; SL : sulfolipide, TDM : tréhalose dimycolate ; TL : couche membranaire transparente aux électrons

[1]

Figure 1 : Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne

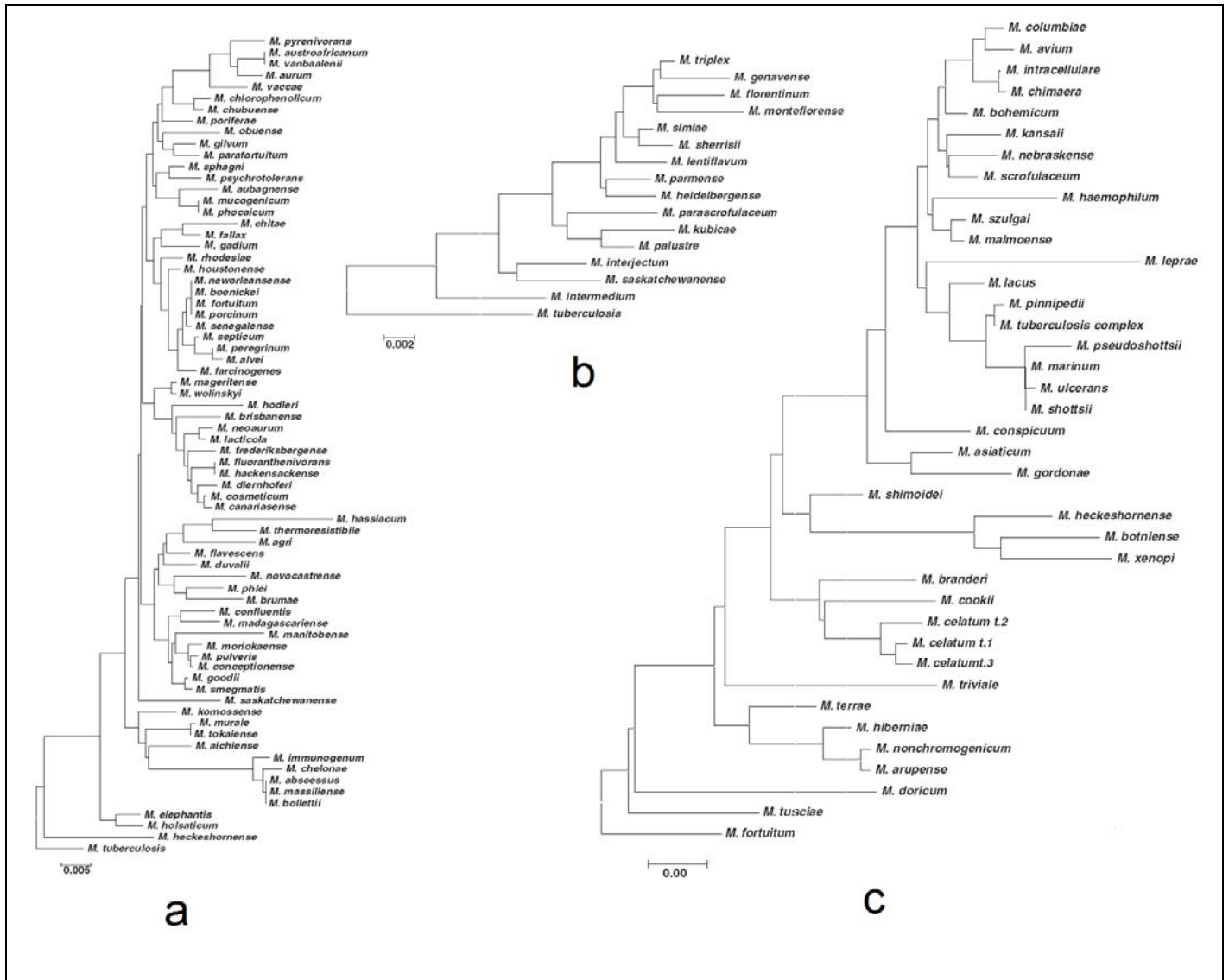
1.1.2 Taxonomie

- La famille

La famille des *Mycobacteriaceae* regroupe l'unique genre *Mycobacterium*, et est intégrée au *phylum* XIV des *Actinobacteria*. Ce *phylum* des *Actinobacteria* se caractérise par des membres présentant un génome riche en guanine-cytosine, comme notamment les genres *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Frankia*, *Corynebacterium* [2-4]. Plus précisément, les genres *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*, se distinguent notamment par la proportion de leur génome en GC, qui sont respectivement de 48 à 59% ; 62 à 70% ; 64 à 69% et 63 à 73% [3]. Ce dernier groupe est nommé CMN dans le *Bergey's* manuel [5] et intègre des bacilles acido-alcool résistants.

- Les espèces du genre *Mycobacterium*

Le genre *Mycobacterium* regroupe les espèces *M. leprae* et *M. lepremurium* responsables de la lèpre, les espèces du MTC (*Mycobacterium tuberculosis* complexe) responsables de la tuberculose comme *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. africanum* et *M. microti*, et les MNT (Mycobactéries non tuberculeuses) représentent pas moins de 110 espèces [6]. Le nombre d'espèces MNT identifiées est passé de 50 en 1997 à 125 en 2007 grâce à l'amélioration des techniques d'isolement et d'identification [7]. La taxonomie des MNT repose dans un premier temps sur leur croissance qui peut être rapide en une à deux semaines, ou lente en plusieurs semaines (Figure 2).



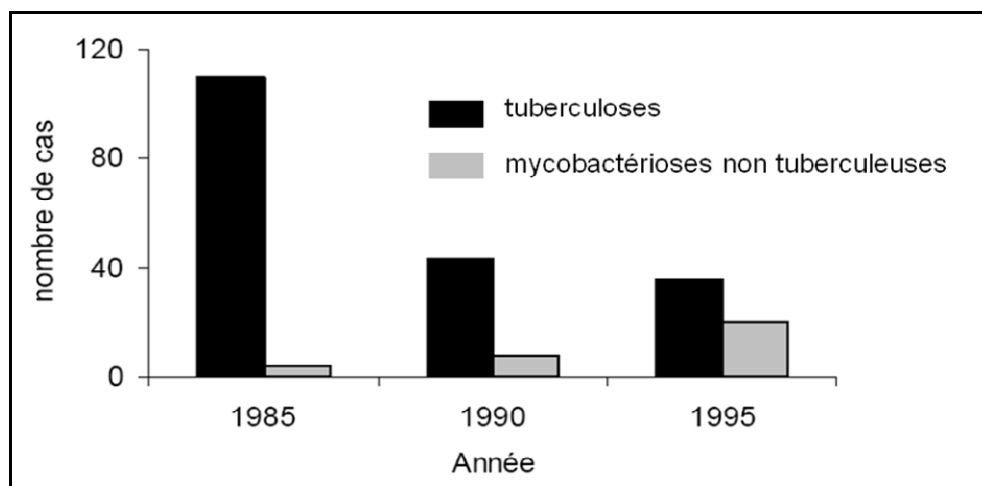
[6]

Figure 2 : Arbre phylogénétique des *Mycobacterium* à croissance rapide (a), à croissance lente caractérisés par une courte hélice 18 (b), et à croissance lente caractérisés par une longue hélice 18 (c) obtenus par séquençage de l'ARNr 16S, avec *M. tuberculosis* comme genre de comparaison

1.2 Incidence chez l'homme liée à l'eau

1.2.1 Aspect quantitatif des infections

Depuis 2004 l'Organisation Mondiale de la Santé reconnaît les MNT comme des pathogènes émergents. En effet dans les pays industrialisés, la fréquence des MNT tend à augmenter et de la tuberculose semble diminuer en nombre (Figure 3). Les maladies liées aux MNT ont été vues dans la plupart des pays industrialisés avec un taux d'incidence de 1 à 2 cas pour 100 000 personnes. Les espèces *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi* et *M. chelonae* sont les plus liées aux infections dans les pays développés [8], et *M. ulcerans* est responsable de l'ulcère de Buruli dans les pays de l'hémisphère sud [9-12].



[13]

Figure 3 : Nombre de cas de tuberculose et de mycobactérioses non tuberculeuses au CHU de Nancy entre 1985 et 1995 suivant une même méthode de détection

1.2.2 Aspect qualitatif des infections

- Les infections pulmonaires

Parmi les infections humaines aux MNT liées à l'eau, l'infection pulmonaire est très décrite. Dans ces cas l'eau sous forme d'aérosol est incriminée et cause des infections à MNT chez des adultes immunodéprimés [14] et des adultes immunocompétents [15-21]. Concernant ces infections pulmonaires à MNT issu d'une inhalation d'aérosols contaminés, les jacuzzi [17, 22], les enceintes de loisir [15, 18, 20], les locaux infiltrés d'eau [16], les locaux de travail [15] et même des enceintes hospitalières [14] et les maisons de particuliers [19, 23], sont des lieux de contamination par voix aériennes décrits au Canada, en Australie, en Finlande et aux USA.

- Les infections cutanées

Les infections cutanées à MNT liées à l'eau sont aussi très décrites. Outre l'ulcère cutané de Buruli causé par l'eau contaminée par *M. ulcerans* dans l'hémisphère sud [9-12], d'autres MNT causent dans l'hémisphère nord des infections cutanées. L'eau de l'environnement a été incriminée dans des cas de dermatites ulcérales chez des personnes âgées en Finlande [24]. Aux USA, de nombreuses études rapportent des cas d'infections cutanées ou des furonculoses chez des personnes immunocompétentes, provoquées par des MNT ayant contaminées l'eau de centres de pédicure [25-28]. Des infections cutanées des membres sous forme de nodules, ont aussi été observées chez des personnes immunocompétentes ayant contracté la MNT après un contact cutané avec de l'eau contaminée de piscine en Chine [29] ou d'aquarium au USA [30]. En France en 2007, des infections à MNT ont été constatées chez des patients de mésothérapie. L'origine de ces infections fut l'eau du robinet contaminée par des MNT, qui a souillé le pistolet d'injection utilisé pour traiter les patients (E. Cambau com. pers. : <http://www.sfh.net/telechargement/paris/CL36.pdf>).

- Les infections ganglionnaires

L'eau en général est une origine possible des infections ganglionnaires à MNT chez les enfants [20, 23]. Plus précisément des infections ganglionnaires à MNT ont pu être causées par l'eau de piscine contaminé aux Pays-Bas [31], ou l'eau du robinet en Suisse et en Italie [32], respectivement chez des enfants et des sujets immunodéficients.

- Les cas particuliers

Certaines infections à MNT liées à l'eau surviennent en raison d'autres facteurs additionnels. Par exemple, les personnes à risques comme les patients HIV+ sont particulièrement sensibles aux infections d'origine aqueuses [15]. Les actes chirurgicaux comme les laparoscopies sont aussi des facteurs augmentant le risque d'infection à MNT liées à l'eau [33]. Il a été aussi décrit des infections post-traumatiques, causées par des contacts avec de l'eau de rivière contaminée par des MNT [34], qui par ailleurs semble pouvoir véhiculer la MNT *M. avium* spp. *paratuberculosis* [35], qui est soupçonnée être l'agent étiologique de la maladie de Crohn [1]. Cette maladie est en général une inflammation du gros intestin sous forme de granulomes, et l'agent responsable de l'infection présente des caractéristiques culturelles et biochimiques semblables à celles de *M. avium* ssp. *paratuberculosis*. A ce jour, l'état des recherches rend difficile d'affirmer que l'agent responsable de la maladie Crohn est *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, ou une nouvelle espèce de mycobactérie, ou encore une cause multifactorielle [36].

1.3 Occurrence dans l'eau

1.3.1 Aspect quantitatif de la prévalence

La quantification des MNT dans l'eau est très mal connue en raison de méthodes non normalisées et en raison de la rareté des études quantitatives qui ne recherchent pas toutes le même ensemble d'espèces (Tableau 1).

Tableau 1 : Rares cas d'étude de quantification non normalisées des mycobactéries (MYC), des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ou d'espèce particulières de mycobactéries dans le milieu aquatique

Article	Type d'eau	recherche	Pays	ufc/l
[37]	système de distribution d'eau potable artificiel	<i>M. xenopi</i>	France (Nancy)	1.10 ¹ - 1.10 ²
[35]	Eau de rivière	<i>M. paratuberculosis</i>	UK	1.10 ³ - 1.10 ⁸
[18]	bain d'un spa	<i>M. avium</i>	Australie	1.10 ³ - 4,3.10 ⁷
[38]	biofilm d'eau potable	MNT	Afrique du Sud (semi urbain)	<4,6.10 ⁵
[39]	système de distribution d'eau potable		USA	2-1.10 ³
[40]	système de distribution d'eau potable		plusieurs (résumé)	1-3,5.10 ³
[24]	eau de l'environnement	MYC	Finlande	9,7.10 ² - 5,8.10 ³
[41]	système de distribution d'eau potable		Finlande	1-1.10 ³
[42]	eau de surface et eau souterraines		France (Paris)	1-5.10 ²
[43]	eau de ruisseau		Finlande	1,0.10 ¹ - 2,2.10 ³

1.3.2 Aspect qualitatif de la prévalence

- L'eau des milieux aquatiques

Plusieurs études indiquent la présence de MNT dans l'environnement aquatique naturel en Grande Bretagne [35, 44], au Malawi [45], au Nouveau Mexique [46], en Espagne [47], en Australie [11], au USA [48] et en Finlande [24]. Il peut s'agir d'une présence dans l'eau de rivière [35, 44, 46], l'eau de lac [11], l'eau d'étang [47] ou l'eau de source thermique [48].

- L'eau de consommation et l'eau usée

Dans l'eau potable du robinet et l'eau potable des systèmes de distribution, la présence de MNT est avérée [20, 40] aux USA [39, 49], en Italie [32], en Finlande [41], en Afrique du sud [38] et en Chine [50]. En France à Paris, des MNT sont présentes dans l'eau de distribution ainsi que les eaux de surface traitées et les eaux souterraines utilisées par les usines de potabilisation [42].

Concernant les eaux usées, la présence des MNT dans les eaux usées de station d'épuration a été décrite dans plusieurs études [20], Aux USA et en Irlande du nord, c'est la présence de *M. avium* spp. *paratuberculosis* qui a été décrite dans des eaux usées [51, 52].

- L'eau d'enceintes de loisir et l'eau d'hôpitaux

Les MNT peuvent contaminer les eaux d'enceintes de loisir comme les salons de pédicure aux USA [26-28], les jacuzzi au Canada [53] et aux USA [17], les bains de spa en Australie [18], ou les bains public [20].

D'autre part, la présence de MNT dans l'eau d'hôpitaux est réelle [14, 20]. Par exemple l'eau d'hémodialyse en Espagne [54], l'eau d'unité dentaire en Angleterre [55] ou l'eau de bain de thérapie au USA [56], ont pu être contaminées par des MNT. Un cas rare de contamination d'une solution bactéricide utilisée dans un hôpital, a même été décrit comme ayant été causé par une mauvaise stérilisation de l'eau utilisée au stade de la fabrication en usine [57].

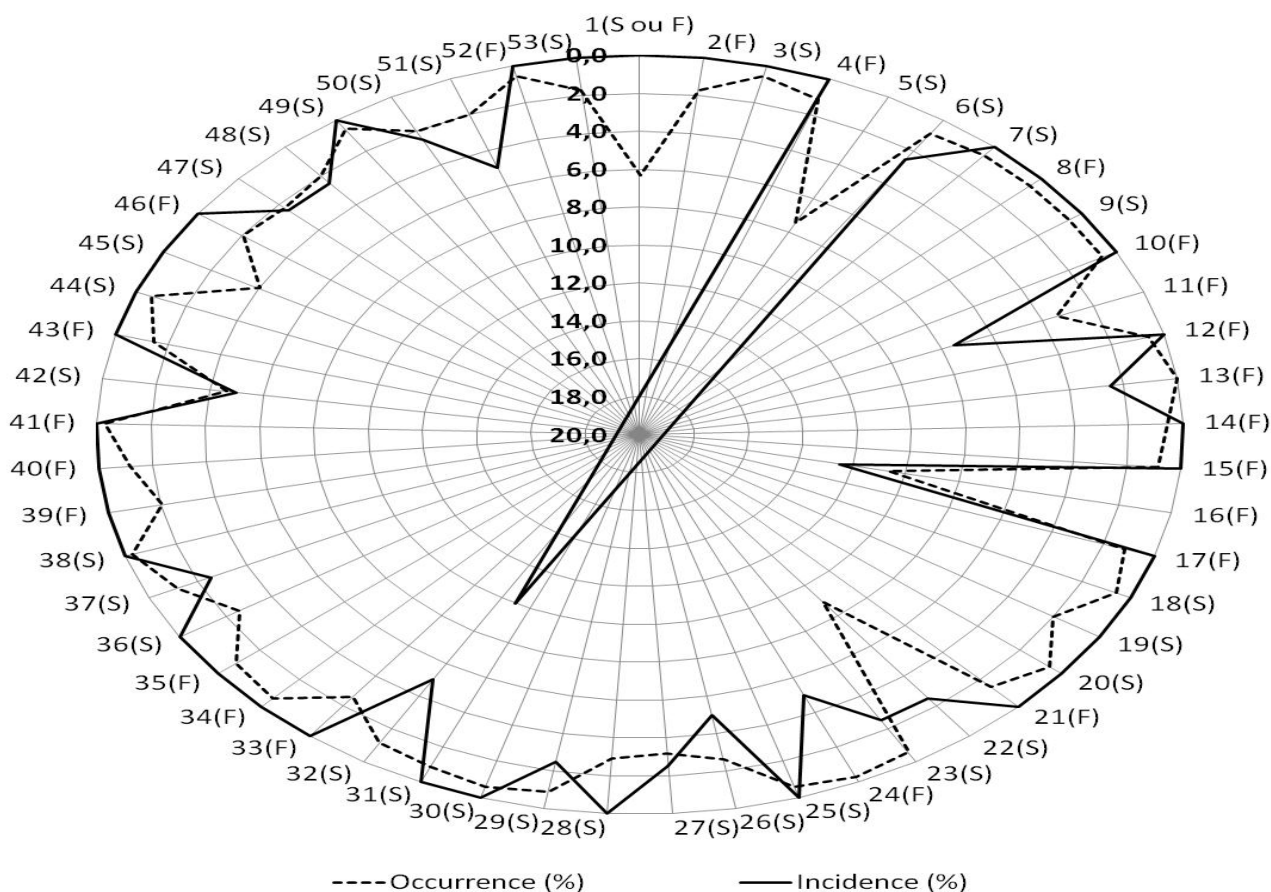
- L'eau d'applications diverses

En parallèle de l'eau de l'environnement, de l'eau de consommation, de l'eau usée, de l'eau d'enceintes de loisirs et de l'eau d'hôpital, des MNT ont pu aussi être isolées d'aérosol d'un fluide d'une usine de métallurgie [58], de systèmes d'irrigation de golf [10, 11], d'eau résidentielle [20], d'eau de baignoire [19] et d'eau infiltrée dans les murs d'un immeuble [59]. En 2008, ce sont des eaux de sources thermales en Auvergne qui sont soupçonnées d'être à l'origine d'un cas d'infections cutanées à MNT chez un patient de carboxythérapie (E. Cambau com. pers.).

1.4 Les espèces d'intérêt dans l'eau

La combinaison des données de la littérature scientifique sur l'incidence chez l'homme des MNT d'origine aqueuse, et des données sur l'occurrence des MNT dans l'eau, nous a permis de recenser 49 espèces d'intérêt (Figure 4). Les espèces *M. avium*; *M. fortuitum*; *M. gordonae*; *M. chelonae*; *M. ulcerans*; *M. scrofulaceum*; *M. intracellulare*; *M. kansasii*; *M. marinum*; *M. szulgai*; *M. terrae* et *M. tusciae* présentent à la fois une incidence chez l'homme liée à l'eau et une occurrence forte dans l'eau (plus de 2% des articles pour chaque espèce). Les espèces *M. xenopi*; *M. abscessus*; *M. gadium*; *M. smegmatis*; *M. simiae*; *M. peregrinum*; *M. nonchromogenicum*; *M. mucogenicum* et *M. lentiflavum* présentent une occurrence forte dans l'eau (plus de 2% des articles pour chaque espèce), et une incidence chez l'homme liée à l'eau faible (moins de 2% des articles pour chaque espèce). Quant aux espèces *M. asiaticum*; *M. aurum*; *M. bohemicum*; *M. botniense*; *M. brumae*; *M. celatum*; *M. chitae*; *M. chlorophenicum*; *M. conceptionense*; *M. diemhoferi*; *M. flavescens*; *M. gastris*; *M. genavense*; *M. gilvum*; *M. haemophilum*; *M. immunogenum*; *M. interjecticum*; *M. mageritense*; *M. malmoense*; *M. murale*; *M. neoaurum*; *M. parascrofulaceum*; *M. phlei*; *M. psychrotolerans*; *M. septicum*; *M. shimoidei*; *M. triplex*; *M. ulcerans* et *M. vaccae*, ces dernières présentent une incidence chez l'homme liée à l'eau et une occurrence dans l'eau faible (moins de 2% des articles pour chaque espèce).

Néanmoins, cette démarche reflète l'occurrence et l'incidence dans la littérature scientifique et non pas l'occurrence et l'incidence réelles. Effectivement certaines MNT comme par exemple *M. avium* sont très étudiées en raison de leur pathogénicité importante, et sont donc plus présentes dans la littérature. Il est donc d'autant plus nécessaire de déterminer empiriquement l'occurrence quantitative et qualitative dans l'eau du bassin versant de la Seine.



1	non identifiée	19	<i>gastri/kansasii</i>	37	<i>paratuberculosis</i>
2	<i>abscessus</i>	20	<i>genavense</i>	38	<i>parascrofulaceum</i>
3	<i>asiaticum</i>	21	<i>gilvum</i>	39	<i>peregrinum</i>
4	<i>aurum</i>	22	<i>gordonae</i>	40	<i>phlei</i>
5	<i>avium (MAC)</i>	23	<i>haemophilum</i>	41	<i>psychrotolerans</i>
6	<i>bohemicum</i>	24	<i>immunogenum</i>	42	<i>scrofulaceum</i>
7	<i>botniense</i>	25	<i>interjecticum</i>	43	<i>septicum</i>
8	<i>brumae</i>	26	<i>intracellulare</i>	44	<i>shimoidei</i>
9	<i>celatum</i>	27	<i>kansasii</i>	45	<i>simiae</i>
10	<i>chitae</i>	28	<i>lentiflavum</i>	46	<i>smegmatis</i>
11	<i>chelonae</i>	29	<i>mageritense</i>	47	<i>szulgai</i>
12	<i>chlorophenolicum</i>	30	<i>malmoense</i>	48	<i>terrae</i>
13	<i>conceptionense</i>	31	<i>malmoense/marinum</i>	49	<i>triplex</i>
14	<i>diemhoferi</i>	32	<i>marinum</i>	50	<i>tusciae</i>
15	<i>flavescens</i>	33	<i>mucogenicum</i>	51	<i>ulcerans</i>
16	<i>fortuitum</i>	34	<i>murale</i>	52	<i>vaccae</i>
17	<i>gadium</i>	35	<i>neoaurum</i>	53	<i>xenopi</i>
18	<i>gastrii</i>	36	<i>nonchromogenicum</i>		

Figure 4 : Combinaison des données de la littérature sur l'occurrence en milieu aquatique (%) et l'incidence chez l'homme dont l'origine aqueuse est avérée ou soupçonnée (%), des espèces de mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide (F) et lente (S)

2 Harmonisation des méthodes de quantification par bactériologie

2.1 Contexte

Les méthodes de quantification des MNT dans l'eau ne sont pas normalisées vis-à-vis de la concentration, de la méthode de décontamination et du milieu d'isolement. Effectivement les auteurs travaillant sur cette matrice utilisent diverses méthodologies empruntées à la microbiologie clinique. Actuellement, ces méthodes n'ont pas été comparées concernant la quantification des MNT dans l'eau. Nous nous proposons donc d'effectuer ces comparaisons afin de déterminer quelle est la méthode empruntée à la microbiologie clinique la plus à même à traiter des échantillons aqueux. Ces méthodes reposent toutes sur l'élimination des microorganismes non mycobactériens en utilisant les facultés de résistances des MYC à certains antibiotiques et aux composés acido-basiques.

2.1.1 Les méthodes de concentration de l'échantillon

- Le matériel de concentration de l'échantillon

La recherche des mycobactéries dans l'eau de l'environnement ou l'eau traitée, est réalisée avec des volumes d'échantillon variant de 10 ml à 1000 ml, et en concentrant par filtration sur membrane à 0,22 µm [24, 43, 60]; par filtration sur membrane à 0,45 µm [42, 61]; par filtration sur membrane à 0,45 µm suivi d'un décrochage des cellules [11, 35]; par filtration sur membrane à 0,45 µm suivi d'un dépôt directe sur milieu de culture [39], ou par centrifugation [18, 62].

- Les techniques de décrochage des cellules de la membrane de filtration

Nos travaux de 2007 [63] utilisant une méthode de concentration comparable à celle utilisée dans le dénombrement de *Legionella* dans l'eau (Norme française T90-431), ont démontré que la concentration par filtration (0,45 µm, 45 mm de diamètre) puis décrochage des cellules par adjonction de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 0,08% final [35] combiné à une sonication de 10 min [42], permettait de récupérer plus de cellules viables que le traitement au SDS à 0,04% final, le traitement au tween 80 à 0,25% final [11], ou le traitement à l'eau (PIREN_rapport_actionMNT2007). Le décrochage des cellules pourrait aussi passer par l'utilisation de desoxycholate/PEG6000 à 0,1%/2.5% final, qui peut être utilisé pour détacher des cellules d'un support [64].

2.1.2 Les méthodes de culture en milieu solide

- Le milieu d'isolement

En raison des exigences métaboliques des MNT, la quantification par isolement de ces dernières nécessite l'utilisation de milieux de culture solide complexes comme le OEY (Ogawa Egg Yolk Medium), le OEOE (Ogawa medium Ofloxacin Ethambutol), le FSM (Falkinham's Selective Medium), le LJ (Lowenstein-Jensen) ou le Middlebrook 7H11 [60, 61, 65], additionnés ou non de Mycobactine J un sidérophore nécessaire pour cultiver certaines espèces comme *M. avium* spp *paratuberculosis* [66-70]. Néanmoins, la richesse de ces milieux implique le développement de microorganismes non mycobactériens de contamination, qui entravent le développement des MNT et en particulier celui des MNT à croissance lente. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec le milieu Middlebrook 7H11 supplémenté en mycobactine J (7H11j), car ce milieu Middlebrook 7H11 est la dernière évolution des milieux synthétiques pour cultiver en milieu solide les mycobactéries. Il intègre l'additif OADC (Oleic acid, bovine Albumin, sodium chloride, Dextrose, Catalase) qui augmente la sensibilité aux mycobactéries [71].

- La supplémentation en antibiotique

Afin de limiter les microorganismes de contamination, le milieu de culture Middlebrook 7H11j peut être supplémenté en antibiotiques. En milieu hospitalier, pour la détection automatisée en milieux liquides, il est notamment utilisé le complexe d'antibiotiques PANTA avec des concentrations finales de 40 U/ml de Polymyxine B, 4 µg/ml d'amphotéricine, 16 µg/ml d'acide nalidixique, 4 µg/ml de triméthoprime et 4 µg/ml de carboxy-pénicilline [72-77]. Ces concentrations ont déjà été utilisées dans du milieu solide Middlebrook 7H11 [67]. Certains auteurs, dans le cas d'échantillons très contaminés, utilisent de la vancomycine à des concentrations de 8,4 µg/ml [67], 10 µg/ml [78, 79] ou encore 20 µg/ml [72] dans le milieu de culture (PANTAV).

- La décontamination chimique

Les caractéristiques d'acido-alcool-résistance des MYC peuvent être utilisées pour éliminer les microorganismes de contamination par décontamination chimique, en utilisant des acides, des bases ou des détergents. Il existe quatre méthodes de référence. La méthode de Löwenstein (H_2SO_4 à 4% v/v) est généralement utilisée pour des échantillons médicaux et vétérinaires très contaminés [80-83], et a aussi été appliquée sur de l'eau de l'environnement [60]. La méthode de Petroff [84] (NaOH à 4% v/v) est toujours utilisée en milieu médical [85-87], et a été testée sur de l'eau artificiellement contaminée [88]. Une méthode plus récente (SLS-NaOH à 3%-1% v/v) appelée Tacquet-Tison [89, 90] utilisée sur de l'eau de l'environnement [60] et de l'eau d'usines de potabilisation [42], a été initialement appliquée à des échantillons cliniques [91-94]. Une méthode aussi récente (NaOH-NALC à 2%-0,5% v/v) appelée Kubica [95] est recommandée par le CDC (Centers of Disease control). Elle a été utilisée sur de l'eau artificiellement contaminée [96] et semble convenir à des échantillons très contaminés comme des fèces [97].

Deux méthodes non référencées sont aussi à noter : la méthode à l'acide oxalique et la méthode au Cetylpyridinium Chloride (CPC). La méthode à l'acide oxalique (COOH)² à 5% v/v est parfois utilisée en milieu médical [98-100] et semble convenir à des échantillons très contaminés comme des fèces [97]. La méthode au Cetylpyridinium Chloride (0,005% final) proposée pour décontaminer de l'eau peu contaminée [101], a été utilisée pour rechercher les mycobactéries dans de l'eau potable domestique [102-104] et hospitalière [105]. Néanmoins, il est conseillé d'utiliser des concentrations plus forte (0,05% final) pour traiter l'eau très contaminée [61].

2.2 Matériel et méthode

Après comparaison des méthodes de concentration sur de l'eau artificiellement contaminée, la méthode de concentration la plus adéquate a été appliquée sur des échantillons de la Seine. Dans un premier temps il a été étudié l'utilité de la supplémentation en antibiotique du milieu de culture, afin de comparer dans un second temps les méthodes de décontamination chimique en utilisant un milieu d'isolement avec ou sans antibiotiques.

2.2.1 Identification des mycobactéries isolées

L'identification des MNT isolées a été effectuée par séquençage de l'ARNr 16S via les amorces universelles bactériennes 8F/907R [106] afin de confirmer le genre *Mycobacterium* et orienter l'espèce. La confirmation de l'espèce a été effectuée par séquençage du gène *hsp65* codant une protéine de résistance aux chocs thermiques rencontrée chez les Actinomycètes via les amorces HSPF3/HSPR4 [107]. L'amplification des *loci* séquencés a été effectuée suivant les conditions décrites par la suite (§3.2.2) et le marquage des produits d'amplification a été réalisé par le kit BigDye Terminator V1.1. Le séquençage a été réalisé par un séquenceur MicroSeq® ID Microbial identification V2.0, muni du logiciel d'acquisition ABI PRISM 3100 Genetic analyser. L'alignement des séquences entre elles a été effectué par un algorithme ClustalW via le logiciel Mega 4 © 1993-2008 version 4.0.2. Ce même logiciel a été utilisé pour comparer les alignements par matrices NJ (Neighborhood Joining) avec 100 répétitions de calcul, et pour construire les dendrogrammes de distance. Les séquences de référence ont été obtenues sur GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Bio Informatic Bacteria Identification (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>).

2.2.2 La méthode de concentration de l'échantillon

Pour cette étude, il a été choisi d'utiliser *M. chelonae* comme espèce de référence, car cette dernière est une MNT à croissance rapide peu exigeante, et fait partie tout comme *M. fortuitum* des MNT à croissance rapide d'intérêt dans l'eau (Figure 4). La comparaison des méthodes de concentration (centrifugation, filtration et décrochage au SDS, filtration et décrochage au desoxycholate et filtration suivi d'un dépôt directe sur le milieu de culture) a fait intervenir l'inoculation artificielle d'eau stérile par *M. chelonae* (ATCC 35752) à des concentrations d'environ 1.10^5 UFC/l, 1.10^4 UFC/l et 1.10^3 UFC/l en accord avec les concentrations déjà observées dans l'eau (Tableau 1). Les dénombrements de ces matrices avant et après traitement de concentration à 3000xg pendant 15 min, ont été effectués en 5 réplicats par dilution décimale, ensemencement sur milieu solide TSA (Trypticase Soja Agar), puis incubation à +30°C avec une lecture après 1 à 2 semaines. Il est à noter que l'ensemble des filtrations a été réalisé avec des membranes en polycarbonate à 0,45 µm de diamètre de pores et 45 mm de diamètre (Millipore Corp) et une rampe de filtration Millipore Corp.

2.2.3 La supplémentation en antibiotiques

Trois répliquats d'un litre d'eau des prises d'eau des usines de potabilisation de Joinville, d'Ivry et d'Orly (Ile de France), ont été concentrés par centrifugation à 7000xg pendant 15 min et repris dans 10 ml d'eau. Après dilutions décimales du concentra ; 0,1 ml des dilutions ont étéensemencés sur des milieux de culture Middlebrook 7H11_J sans antibiotiques, supplémentés à 2% (v/v) de PANTA PLUS, et supplémentés à 2% (v/v) de PANTA PLUS et 10 µg/ml de vancomycine, puis incubés à +30°C (condition de culture habituelle). En plus des milieux Middlebrook 7H11_J supplémentation à 2% (v/v) de PANTA PLUS et 10 µg/ml de vancomycine, ont été incubés à température ambiante afin de se mettre dans des conditions de températures proche de celles de la Seine. Des colorations de Gram et de Ziehl-Armand (Kit Quick-TB, RAL®) ont été effectuées sur les concentras pour apprécier la contamination globale avant dilution, et des colorations de Ziehl-Armand après culture ont permis de distinguer les mycobactéries des microorganismes de contamination à 48h d'incubation et tous les 7 jours jusqu'à confluence de ce dernières. Les souches de mycobactéries isolées de ces échantillons ont été conservées sur milieu Löwenstein-Jensen à +30°C et dans du dextrose-glycérol (v/v) à -20°C.

2.2.4 La méthode de décontamination chimique

L'étude des procédés de décontamination chimique, a été effectuée en 3 répliquats sur des prélèvements d'eau de Seine à la prise d'eau de l'usine de potabilisation d'Orly. Sur ces prélèvements, les méthodes de décontamination chimique de Löwenstein (H₂SO₄ à 4% v/v), de Petroff (NaOH 4% v/v), de Tacquet-Tison, (SLS-NaOH à 3%-1%), de Kubica (NaOH-NALC à %/0,5 v/v), et les méthodes à l'acide oxalique (COOH)₂ à 5% v/v et au CPC (0,05% final), ont été comparées. Pour toutes ces méthodes, le milieu Middlebrook 7H11_J a étéensemencé et incubé à +30°C, et des colorations de Ziehl-Armand à 48h d'incubation et tous les 7 jours ont permis de différencier les mycobactéries des microorganismes de contamination, jusqu'à confluence de ces dernières. Les souches de mycobactéries isolées de ces échantillons ont été conservées sur milieu Löwenstein-Jensen à +30°C et dans du dextrose-glycérol (v/v) à -20°C.

2.1 Résultats et discussion

2.1.1 L'identification des bacilles acido-alcoolo-résistants isolés de la Seine

L'identification par séquençage de l'ARNr 16S des bacilles acido-alcoolo-résistants isolés de l'eau de la Seine au niveau de la prise d'eau de l'usine de potabilisation de Orly, a permis de confirmer la présence des genres *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Nocardia* (Figure 5). Les genres *Rhodococcus* et *Nocardia*, ont par ailleurs été confirmés par séquençage de *hsp65* (Figure 6). Quant-aux ambiguïtés d'identification de l'espèce de *Mycobacterium* par séquençage de l'ARNr 16S, ces dernières ont été levées par le séquençage de *hsp65* (Figure 5 et Figure 6). Seule la souche attribuée à *Mycobacterium psychrotolerans* par séquençage de l'ARNr 16S, n'a pas été confirmée par séquençage de *hsp65* du fait qu'il n'existe pas dans les bases de données la séquence de ce gène pour cette espèce. En somme, une grande diversité d'espèces de MNT ont été isolées de l'eau de la Seine au niveau de la prise d'eau de l'usine de potabilisation de Orly, en particulier les espèces *M. austroafricanum* ; *M. arupense* ; *M. chelonae* ; *M. insubricum* ; *M. llutzerense* ; *M. porcinum* ; *M. psychrotolerans* et *M. setense*.

2.1.2 Les espèces de MNT isolées de la Seine

- Les espèces de MNT connues historiquement

Parmi les espèces de MNT que nous avons isolées de la Seine, les plus citées dans la littérature sont les espèces *M. austroafricanum* ; *M. porcinum* et *M. chelonae*. D'après la littérature (§1.4) l'espèce *M. chelonae* est prédominante dans l'eau et majeure concernant les pathologies humaines liées à l'eau. Plus précisément, *M. chelonae* a pu être isolée de système de distribution d'eau potable [40], d'eau potable du robinet [49], d'eau souterraine et de surface utilisée par des usines de potabilisation [42], de bain de salons de pédicures [26] et de bains publique [20]. Sur le plan pathologique, *M. chelonae* peut provoquer chez l'homme des infections pulmonaires par inhalation d'aérosols [20], des infections cutanées par contact avec de l'eau contaminée [26], et des infections postopératoires causées par la contamination d'origine aqueuse du matériel chirurgical [33]. Proposée en 1983 et initialement isolée de l'eau en Afrique du Sud [108], l'espèce *M. austroafricanum* est reconnue comme ayant des facultés à dégrader certains hydrocarbures [109, 110], et a déjà été isolée de patients atteints d'arthrites septiques [111]. L'espèce *M. porcinum* a été proposée en 1983 comme espèce pathogène pour le porc et provoque des lésions ganglionnaires chez ce dernier [112]. Chez l'humain, *M. porcinum* peut provoquer des ostéomyélites postopératoires, qui sont des infections des os et des articulations suite à des interventions chirurgicales [113]. Concernant cette espèce *M. porcinum*, des infections humaines sont à noter suite à des actes iatrogènes et des pneumonies sont possibles chez l'homme [114].

- Les espèces de MNT décrites récemment

Parmi les espèces de MNT que nous avons isolées de la Seine, celles décrites récemment sont les espèces *M. arupense* ; *M. insubricum* ; *M. llutzerense* ; *M. psychrotolerans* et *M. setense*. Isolée de patients humains aux USA, *M. arupense* a été proposée en 2007 [115]. Au Japon, *M. arupense* a été la cause d'une Tenosynovite palmaire chez une femme diabétique en 2008. Cette pathologie est une inflammation de la membrane des tendons de la main [116]. L'espèce *M. insubricum* a été isolée en milieu hospitalier et proposée par Tortoli *et al.* en 2007 dans GenBank sans publication rattachée, et l'espèce *M. llutzerense* a été isolée d'eau d'hémodialyse et proposée en 2008 comme nouvelle espèce de MNT [117]. Proposée en 2004 et initialement isolée de l'eau d'un étang proche d'une mine d'uranium, l'espèce *M. psychrotolerans* se caractérise par sa capacité à se développer en +4°C et +37°C et sa capacité à résister à une salinité de 7% [118]. Cette espèce *M. psychrotolerans* n'a pour le moment pas été attribuée à une pathologie humaine. L'espèce *M. setense* a été proposée en 2008 suite à un isolement d'un cas d'infection post-traumatique de la peau et de l'os en France [119]. Récemment, *M. setense* a été la cause d'une infection suite à une greffe osseuse buccale à Marseille. Bien que non isolée de l'eau la bactérie fut soupçonnée de provenir de l'eau du robinet avec laquelle le patient a avoué s'être rincé la bouche après l'intervention [120].

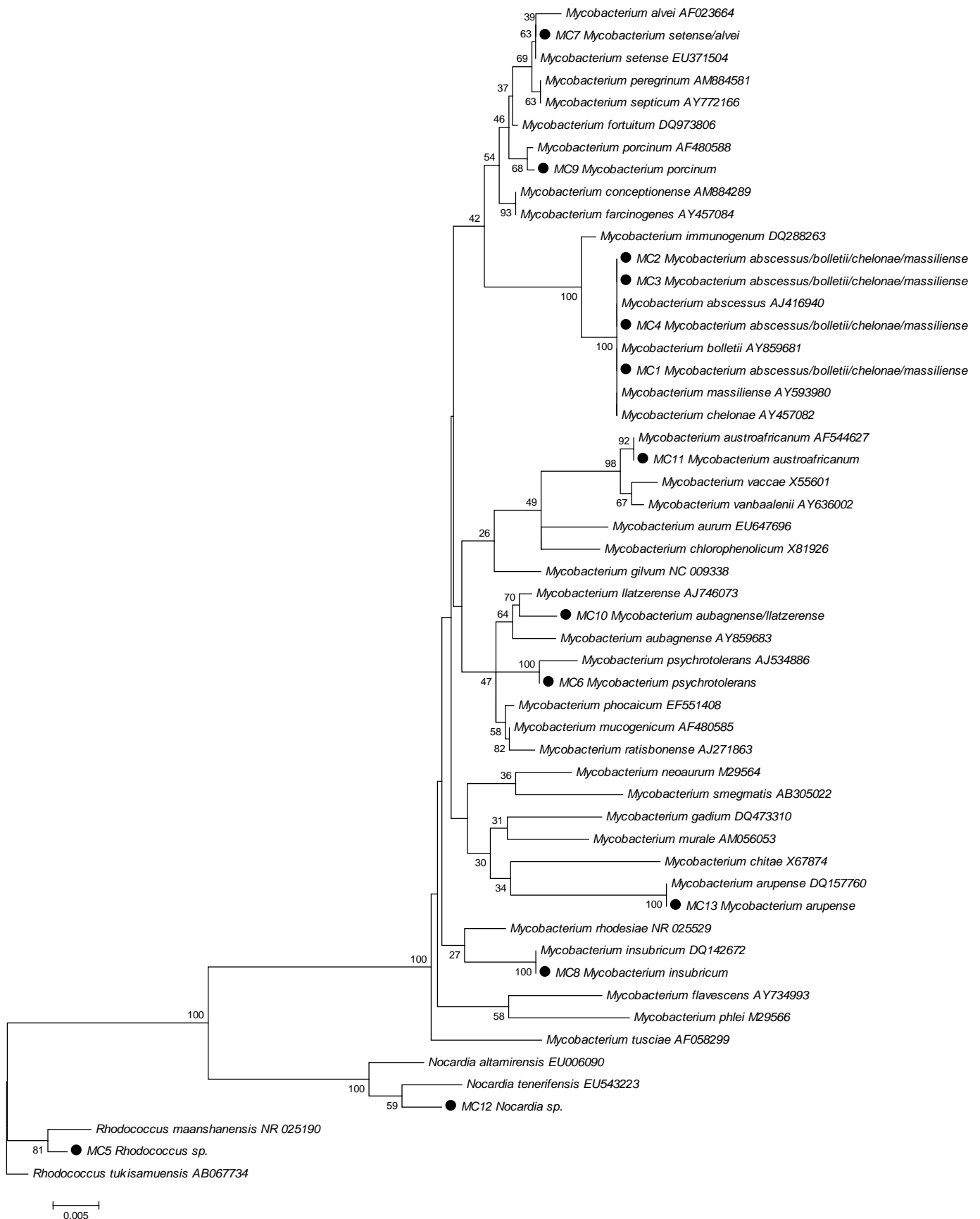


Figure 5 : Identification des bacilles acido-alcoolo-résistants à croissance lente isolées de l'eau de la Seine à la prise d'eau de l'usine de potabilisation de Orly (disque noir) par séquençage de l'ARNr 16S via le couple d'amorces 8F/907R et comparaison à des séquences de référence (numéro d'accension GenBank)

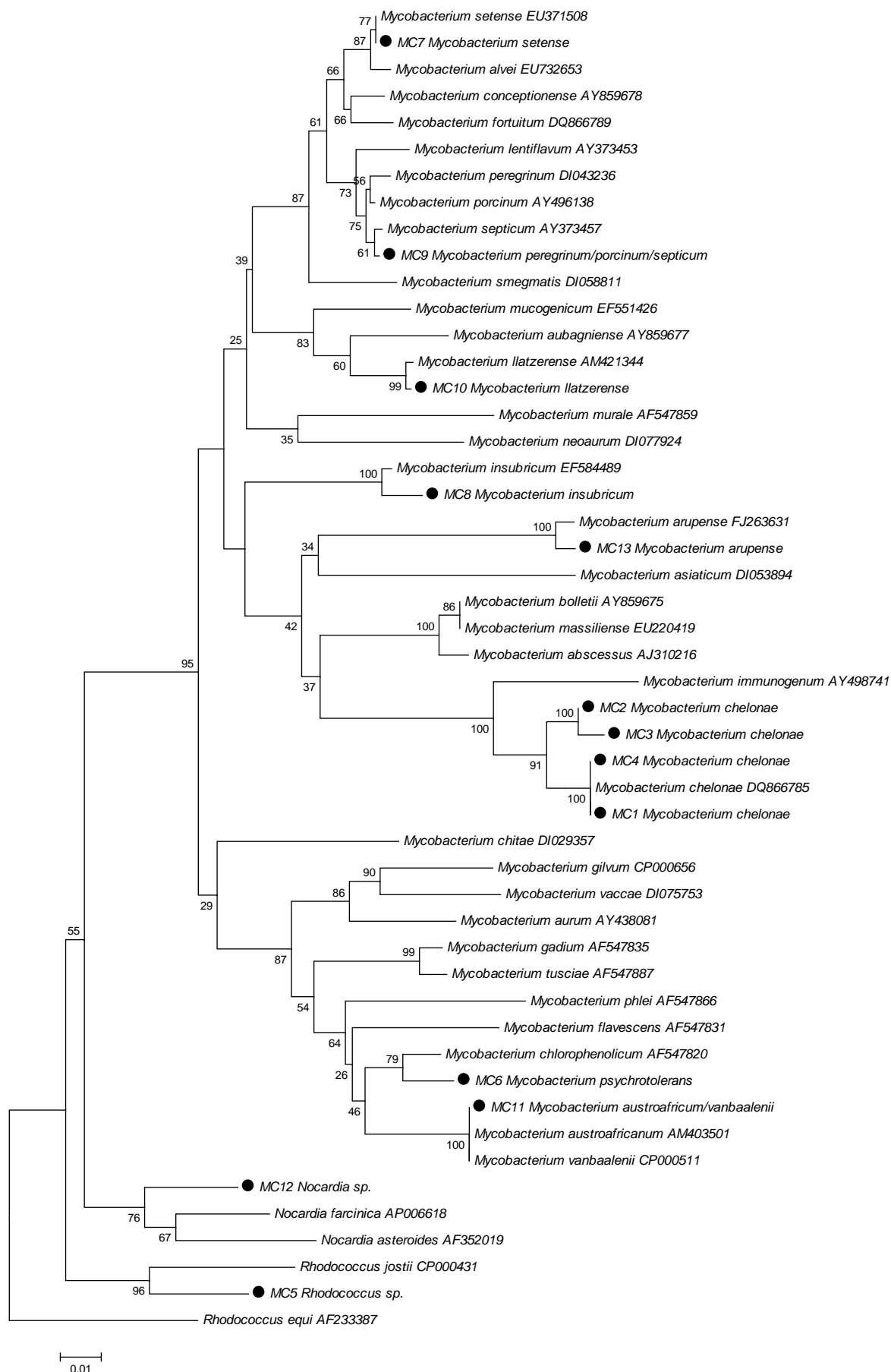


Figure 6 : Identification des bacilles acido-alcool-résistants à croissance lente isolées de l'eau de la Seine à la prise d'eau de l'usine de potabilisation de Orly (disque noir) par séquençage de *hsp65* via le couple d'amorces HSPF3/HSPR4 et comparaison à des séquences de référence (numéro d'accèsion GenBank)

2.1.3 La méthode de concentration de l'échantillon

- Echantillon artificiellement contaminé

L'analyse des variances sur les données de comparaison des méthodes de concentration de l'eau artificiellement contaminée par *M. chelonae* (Figure 7), indique que les traitements réalisés sont significativement différents (ddl 3 ; $p < 0,0001$), contrairement au jour d'analyse (ddl 2 ; $p = 0,7475$) et à la densité cellulaire (ddl 2 ; $p = 0,9229$). De plus le Test de Tukey indique que le traitement par filtration et décrochage au SDS est comparable au traitement par filtration et dépôt direct de la membrane, et que le traitement par centrifugation est comparable au traitement par filtration et décrochage au désoxycholate/PEG. Le plus fort rendement de récupération cellulaire obtenu est celui du traitement par filtration et dépôt directe sur la membrane, mais ce dernier semble moins reproductible (récupération cellulaire : $80 \pm 43\%$) que le traitement par filtration et décrochage au SDS (récupération cellulaire : $72 \pm 24\%$), certainement en raison de la surface de dénombrement plus faible pour cette seconde méthode. Le plus faible rendement de récupération cellulaire obtenu est celui du traitement par filtration et décrochage au désoxycholate/PEG (récupération cellulaire : $31 \pm 22\%$), qui est de plus moins reproductible que le traitement par centrifugation (récupération cellulaire : $38 \pm 8\%$). Ce traitement par centrifugation est d'autre part le traitement le plus reproductible, certainement en raison d'un nombre d'étapes moindre que les traitements de filtration.

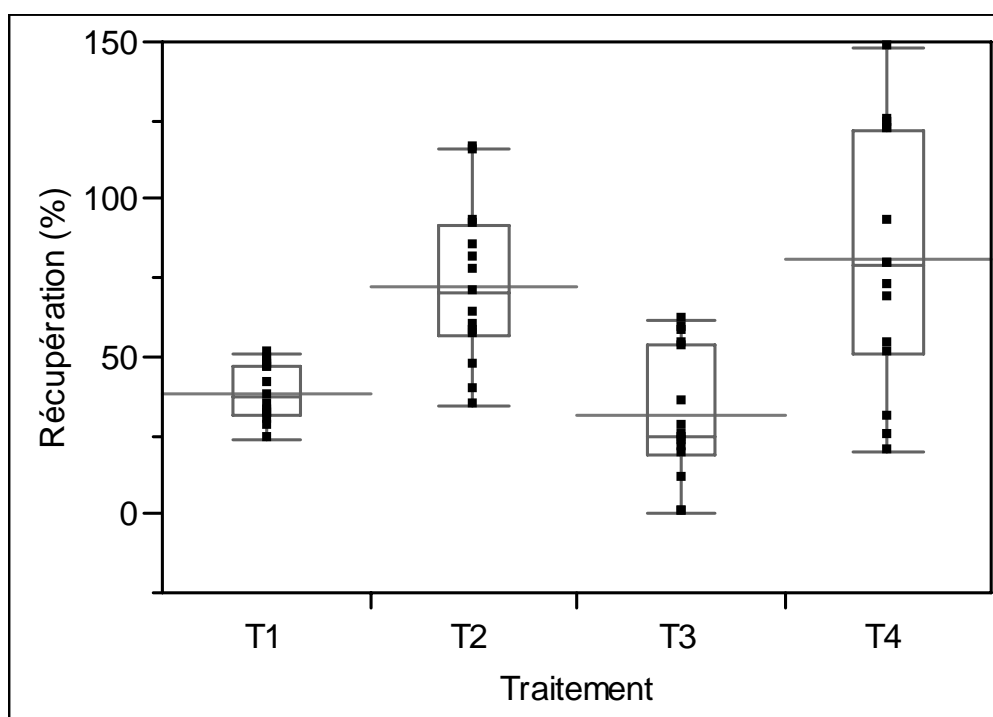


Figure 7 : Rendement de récupération de *M. chelonae* (ATCC 35752) dans de l'eau artificiellement contaminée suite à des traitements de concentration par centrifugation 15 min à 3000xg (T1), de filtration à 0,45 µm et décrochage au SDS à 0,08% (T2), filtration à 0,45 µm et décrochage au désoxycholate/PEG à 0,1%/2,5% (T3) et filtration à 0,45 µm et dépôt direct (T4)

- Echantillon d'eau de station d'épuration

Il n'a été possible de filtrer sur des membranes à 0,45 µm qu'environ 10 ml de l'eau issue de prélèvements en entrée et en sortie de la station d'épuration de Colombes, alors que la concentration par centrifugation n'a pas posé de problème technique. Concernant la force de centrifugation, nous avons augmenté celle-ci à 7000xg pendant 15 min pour obtenir un culot de centrifugation compact. Pour garder une bonne sensibilité de la méthode sur des volumes concentrés importants, la concentration des échantillons très contaminés comme ceux des eaux usées, des eaux de la Seine, ou des eaux de ruissellement, doit donc être réalisée par centrifugation à au moins 7000xg pendant 15 min.

2.1.4 La supplémentation en antibiotique

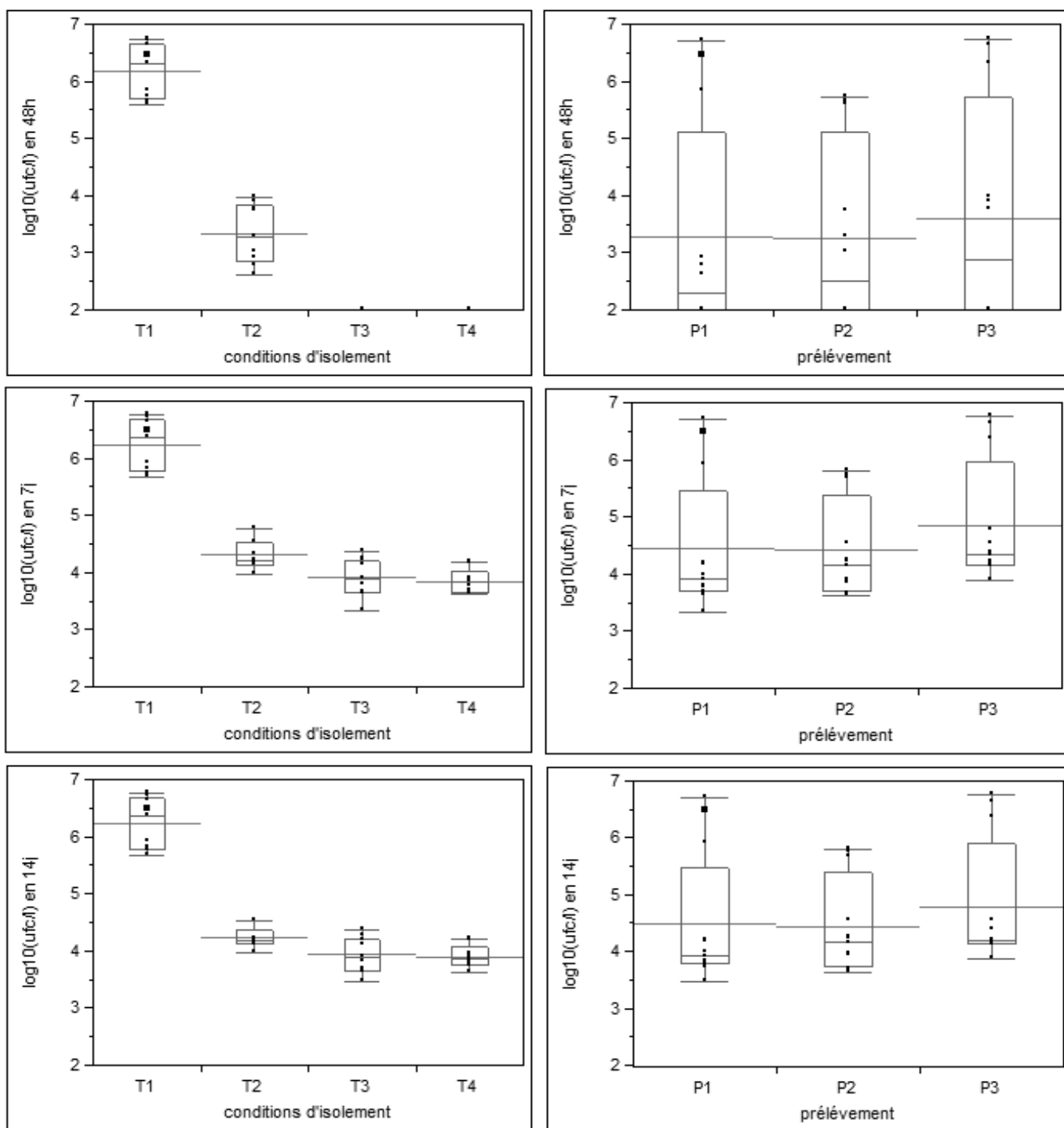
- Les microorganismes de contamination

L'analyse des données par modèle linéaire généralisé indique que le traitement et le lieu de prélèvement expliquent la variation de la concentration des microorganismes de contamination ($p < 0,05$). Toutes conditions d'isolement prises en compte, le lieu de prélèvement conditionne la quantification des microorganismes de contamination, qui semble plus élevée à la prise d'eau de l'usine de potabilisation d'Orly, qu'aux prises d'eau de Joinville et de Ivry, avec respectivement en moyenne 3,25 log et 3,5 log en 48h d'incubation ; 4,5 log et 5 log en 7j et 14j d'incubation (Figure 8). Pour l'ensemble des prélèvements, la densité des microorganismes de contamination semble se stabiliser en 7j en atteignant des valeurs semblables à celles observées en 14j.

Tous lieux de prélèvement pris compte, en 48h la concentration des microorganismes de contamination atteint en moyenne 6,5 log et reste stable jusqu'à 14j d'incubation à +30°C sur milieu Middlebrook 7H11_j sans antibiotiques (Figure 8). En présence de PANTA à +30°C, ces microorganismes de contamination n'atteignent que 3,5 log en 48h et se stabilise à 4,25 log en 7j. En présence de PANTAV à +30°C ou +20°C, ces microorganismes de contamination sont absents en 48h d'incubation ou non détectable (limite de détection inférieure : 2 log), et semblent être stable en 7j à hauteur de 3,75 log. En somme, la supplémentation en antibiotique PANTA, ainsi que l'adjonction de vancomycine permet de limiter les microorganismes de contamination de l'eau de la Seine, mais ne permet pas de prolonger l'incubation à +30°C ou à température ambiante au delà de 14 jours, en raison d'un envahissement des boîtes de culture par des moisissures.

- Les mycobactéries

Seulement sur le prélèvement de la prise d'eau de l'usine de Orly, trois souches de mycobactéries ont été isolées sur les milieux supplémentés en PANTA ou en PANTAV et incubées à +30°C ou à température ambiante, à des valeurs comprises entre 2,3 et 3,2 log sur chacun des réplicats. Néanmoins, il est à noter que la supplémentation du 7H11_j en antibiotique PANTA avec ou sans vancomycine, permet d'isoler des mycobactéries à +30°C ou +20°C, qui par ailleurs n'ont pas été isolées du 7H11_j sans antibiotiques. De plus, sur le milieu 7H11_j supplémenté en PANTAV, les mycobactéries ont été isolées en 7j à +30°C et en 14j à température ambiante. La supplémentation en PANTA ou PANTAV, ne semble donc pas inhiber la croissance des MNT isolées et l'incubation à +30°C permet d'obtenir des MNT à croissance rapide plus rapidement qu'à température proche de celle de la Seine. D'autre part, les souches isolées ont été identifiées par séquençage partiel de l'ARNr 16S comme de l'espèce *M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. chelonae* ou *M. massiliense* et l'espèce *M. chelonae* a été confirmée par séquençage partiel du gène *hsp65* (Figure 5 et Figure 6).



Limite de détection : 2log

Figure 8 : Evolution en 48h, 7j et 14j des microorganismes de contamination sur du milieu Middlebrook 7H11; sans antibiotique à +30°C (T1), supplémenté en antibiotiques PANTA à +30°C (T2), supplémenté en antibiotique PANTAV à +30°C (T3) et supplémenté en PANTAV à température ambiante (T4), dans de l'eau de Seine prélevée aux prises d'eau des usines de potabilisation de Joinville (P1), d'Ivry (P2) et d'Orly (P3) en 3 réplicats

2.1.5 La décontamination chimique

- Les microorganismes de contamination

Concernant les milieux sans antibiotiques, les méthodes de décontamination permettent de diminuer d'environ 3,0 log les microorganismes de contamination en passant d'environ 7,5 log à 4,5 log quelle que soit la méthode de décontamination chimique. Par analogie l'utilisation d'antibiotiques dans le milieu permet de faire passer les microorganismes de contamination de 7,5 log à 4,5 log si aucune décontamination chimique n'est effectuée. L'utilisation d'une méthode de décontamination chimique seule semble donc être aussi efficace que l'utilisation seule d'antibiotiques dans le milieu de culture.

Quelle que soit la méthode de décontamination chimique utilisée, la concentration en microorganismes de contamination sur les milieux avec antibiotiques est toujours plus faible que celle sur les milieux sans antibiotiques, indiquant que l'effet de ces derniers n'est pas inhibé par la méthode de décontamination chimique (Figure 9). Cet écart entre la concentration en microorganismes de contamination sur les milieux avec et sans antibiotiques peut aller jusqu'à 3,0 log, et l'utilisation d'antibiotiques dans le milieu de culture en combinaison avec l'utilisation d'une méthode de décontamination chimique semble être préférable à l'utilisation séparée de ces méthodes d'élimination des microorganismes de contamination.

Par ailleurs et quelle que soit la méthode de décontamination chimique, la poursuite dans le temps des dénombrements a été limitée par l'envahissement des boîtes de culture. Cet envahissement est principalement causé par des microorganismes présentant des formes sporulées, à savoir des *Bacillus* pour les milieux sans antibiotiques et des moisissures pour les milieux avec antibiotiques (Figure 9).

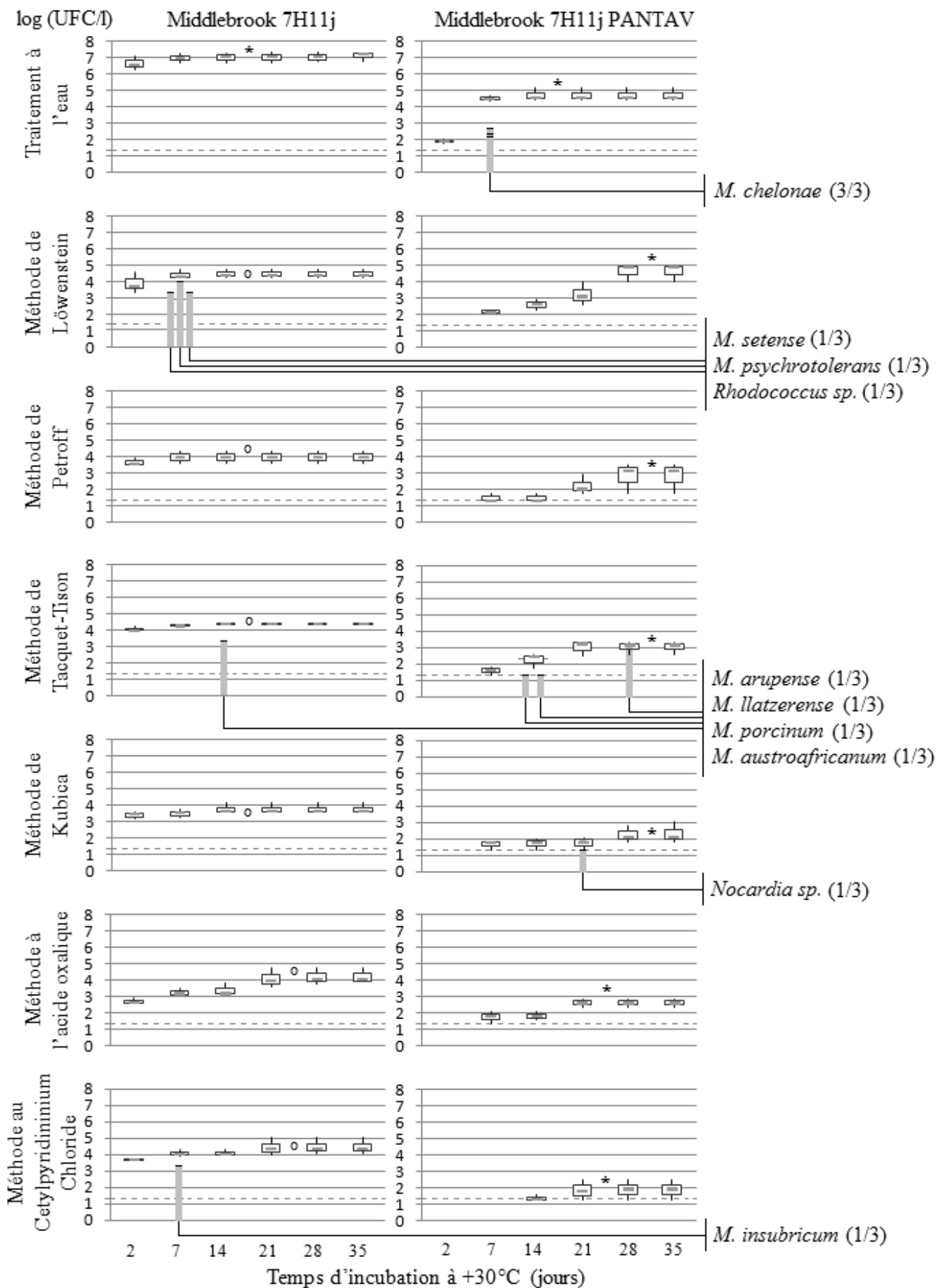
Aucune des méthodes de décontamination chimiques n'a permis d'éliminer la totalité des microorganismes de contamination (Figure 9). Concernant les microorganismes de contamination sur milieu avec antibiotique, la méthode de décontamination chimique la plus décontaminante est la méthode au CPC (limitation des microorganismes de contamination jusqu'à 14j, qui atteint environ 2log à 35j d'incubation), vient en suite la méthode à l'acide oxalique et la méthode de Kubica (limitation des microorganismes de contamination jusqu'à 7j, qui atteint entre 2 et 3log à 35j d'incubation), les méthodes de Taquet-Tison et de Petroff (limitation des microorganismes de contamination jusqu'à 7j, qui atteint environ 3log à 35j d'incubation) et la méthodes Löwenstein (limitation des microorganismes de contamination jusqu'à 7j, qui atteint environ 5log à 35j d'incubation).

- Les mycobactéries

L'identification des bacilles acido-alcoolo résistants par séquençage de l'ARNr 16S et de *hsp65* (Figure 5 et Figure 6) a révélé l'isolement des genres *Nocardia* et *Rhodococcus* respectivement par les méthodes de Kubica et Löwenstein (Figure 9). La confirmation par biologie moléculaire du genre *Mycobacterium* semble donc être une nécessité concernant l'eau de surface analysée (Figure 5 et Figure 6).

Par ailleurs, sans décontamination chimique et sur milieu avec antibiotiques, *Mycobacterium chelonae* est dénombré dans des proportions semblables sur les trois prélèvements réalisés (2,5 log ; 2,2 log et 2,6 log). Par opposition, les MNT isolées par les méthodes de décontamination chimiques (*M. setense*, *M. psychrotolerans*, *M. arupense* ; *M. llatzerense* ; *M. porcinum* ; *M. austroafricanum* et *M. insubricum*) n'ont pas été isolées pour chaque réplique (Figure 9). Les différentes étapes de la décontamination chimique ne permettent donc pas de conserver une bonne répétabilité. Cette observation est certainement due à la létalité partielle des méthodes de décontaminations chimiques vis-à-vis des MNT [121]. Néanmoins, l'élimination des microorganismes de contamination est une nécessité pour isoler les MNT. L'utilisation d'antibiotiques doit être envisagée avant les méthodes de décontamination, mais la combinaison des deux est nécessaire pour traiter des échantillons très contaminés.

Concernant la faculté d'isolement de différentes espèces de MNT, la méthode de Taquet-Tison semble être celle donnant de meilleurs résultats avec quatre espèces isolées (*M. arupense* ; *M. llatzerense* ; *M. porcinum* *M. austroafricanum*), vient ensuite la méthode de Löwenstein avec deux espèces isolées (*M. setense* ; *M. psychrotolerans*), la méthode au CPC avec une espèce isolée (*M. insubricum*), puis les méthodes à l'acide oxalique, la méthode de Petroff, ainsi que la méthode de Kubica qui n'ont pas permis d'isoler de MNT. De plus, la forte charge en microorganismes de contamination des eaux de surface n'a pas permis d'isoler de MNT à croissance lente.



o : confluence de *Bacillus* ; * : confluence de moisissures ; --- : limite de détection inférieur 1,3log

Figure 9 : Evolution sur du Middlebrook 7H11j des microorganismes non mycobactériens (boîtes à moustaches) et des bacilles acido-alcoolo résistants (barres grises) isolés de l'eau de la Seine à la prise d'eau de l'usine de potabilisation d'Orly en 3 réplicats

3 Développement d'une méthode de quantification par biologie moléculaire

3.1 Contexte

3.1.1 Une méthode de quantification alternative à la bactériologie

Face à la difficulté de quantification des MNT par bactériologie en raison de la quantité importante de microorganismes non mycobactériens dans l'eau de la Seine et la longueur des incubations (jusqu'à 2 mois pour les MNT à croissance lente), plus la lourdeur du protocole (dilutions, ensemencement, lecture multiples, vérification par coloration de Ziehl...), nous avons entrepris d'explorer la possibilité de quantifier ces MNT par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel. Effectivement cette méthode de détection et de quantification pourrait être beaucoup plus rapide que la quantification par bactériologie, et donc envisageable dans un objectif d'analyse exhaustive. La méthode de bactériologie reste nécessaire pour analyser en détail les MNT (identification des espèces, résistance aux antibiotiques, caractérisation moléculaire...).

3.1.2 Démarche du choix des amorces PCR

Afin de s'assurer de la spécificité de méthode de PCR en temps réel en développement, il a été entrepris de sélectionner les amorces PCR de la littérature, et de les tester par PCR classique sur des souches non mycobactériennes isolées de la Seine et provenant de cultures de référence.

3.2 Matériel et méthode

3.2.1 Etude théorique

- Les amorces de la littérature

En 2007, il s'est avéré que la méthode de PCR en temps réel proposée sur le gène *hsp65* [122] était non spécifique (PIREN_rapport_actionMNT2007) [63]. Une analyse théorique de la spécificité et de la sensibilité des amorces de la littérature sur les gènes *sodA* [54, 123-125], *pncA* [126], *recA* [127], *rpoB* [128-130], *rrs* [45, 54, 131-139], *gyrA* et *gyrB* [140, 141], et *hsp65* [122, 124, 126, 128, 142-149], a donc été menée par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur la base de données internationale GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information), afin de les classer par ordre de priorité concernant le développement d'une PCR en temps réel (Figure 10).

- La sélection des amorces

D'après l'analyse théorique effectuée (Figure 10) et les tailles respectives d'amplification, les couples d'amorce SodF/SodR [123, 124], Z261/Z212 [54, 125], *gyrBA/gyrBE* [140], F119/R184T7 [141] et Tb11/Tb12 [122, 124, 126, 128, 142-149] semblent convenir au développement d'une PCR en temps réel de quantification des MNT. D'autre part les couples MycF/MycR [45, 136], 246/R266267 [131] et 110F/I571R [134] ont aussi été retenus en raison d'une spécificité relative indiquée par l'auteur.

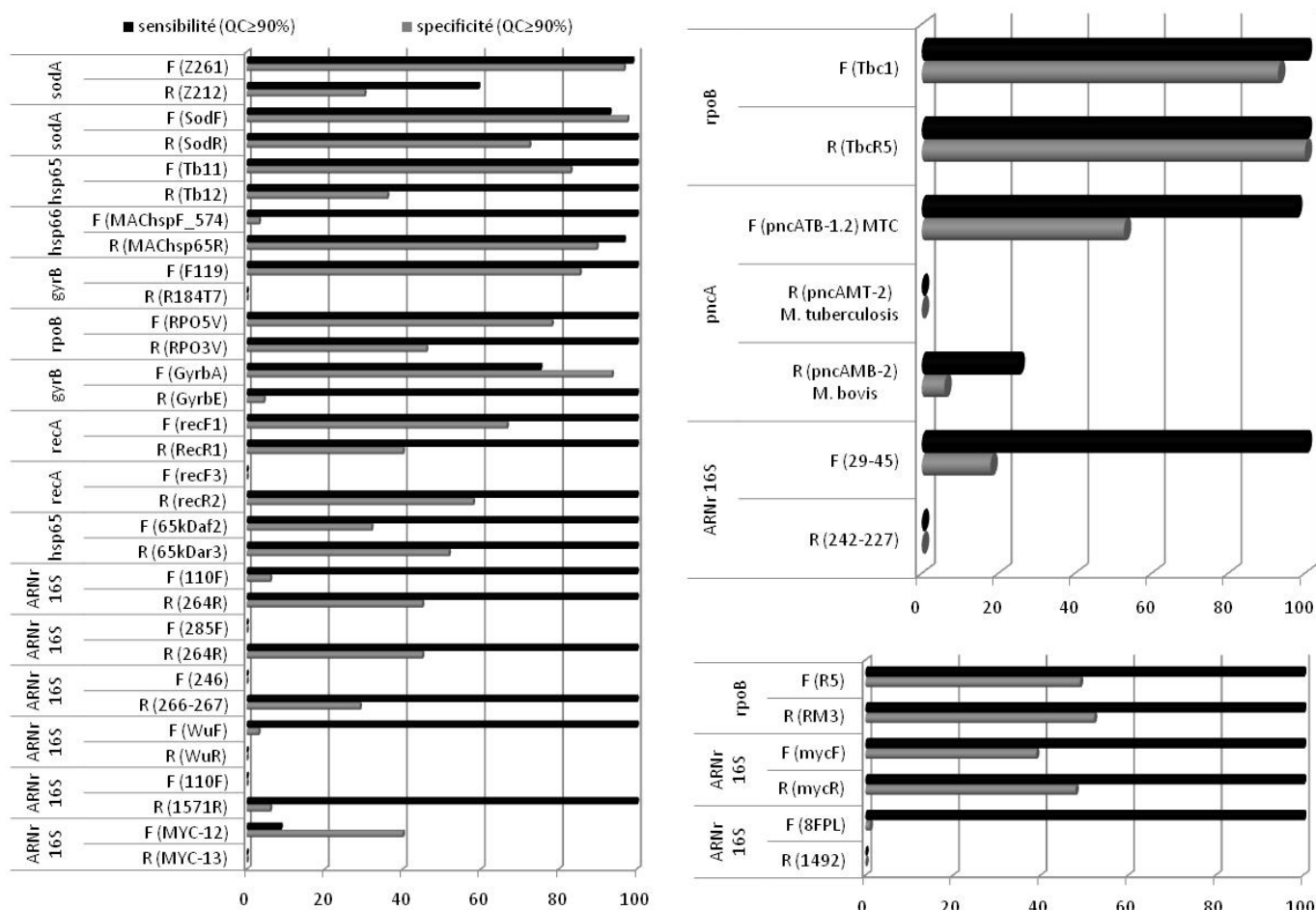


Figure 10 : Sensibilité et spécificité théoriques (%) des couples d'amorces sens (F) et anti-sens (R) de la littérature vis-à-vis des gènes de ménage des mycobactéries (à gauche), des mycobactéries tuberculeuses (en haut à droite) et des mycobactéries non tuberculeuses (en bas à droite)

3.2.2 Etude empirique

- Création d'un soucier non spécifique

Deux échantillons provenant pour l'un du pont de Choisy et pour l'autre du pont de Ivry, ont été dilués par dilution décimale et ensemencés sur des milieux non sélectif : TSA (Trypticase Soja Agar Yeast Extract) et TSS (Trypticase Soja Sang de Cheval), ainsi que des milieux sélectifs : Drigalski pour isoler les bactéries Gram -, Columbia CNA (Columbia Acide Nalidixique) pour isoler les bactéries Gram + et SAB (Sabouraud chloramphénicol) pour isoler champignons microscopiques. L'eau de la Seine étant un milieu oxygéné les cultures ont été effectuées en aérobiose à +30°C. Afin de sélectionner 50 souches de contamination les plus diverses possibles, il a été retenu des souches présentant des caractéristiques macroscopiques, microscopique (coloration de Gram) et physiologiques (recherche de la catalase et de l'oxydase) diverses. A ce soucier a été ajouté des souches de référence non isolées de la Seine, éloignées de MYC comme *Helicobacter pylori* et génétiquement proches des MYC comme des *Corynebacterium*, des *Nocardia* et des *Frankia* [2-4].

- Identification du soucier de contamination

L'identification des germes de contamination a été effectuée par extraction du génome et séquençage sens et anti-sens de 500 pb de l'ARNr 16S, via le séquenceur MicroSeq® ID Microbial identification V2.0, muni du logiciel d'acquisition ABI PRISM 3100 Genetic analyser et du logiciel de traitement Foundation data collection (Applied Biosystems). L'alignement des séquences entre elles a été effectué par un algorithme ClustalW via le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor © 1997-2007 version 7.0.9.0. Ce même logiciel a été utilisé pour comparer les alignements par matrices NJ (Neighborhood Joining) avec 100 répétitions de calcul. Les matrices de guidage d'arbre ont été utilisées pour construire des dendrogrammes de distance génétique à l'aide du logiciel Dendroscope 2008 version 1.2.4. Les séquences de référence ont été obtenues sur GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- Extraction d'ADN pour amplification PCR

Suite à une suspension cellulaire d'environ 5 µl dans 100 µl de TE à 1X (10 mM Tris ; 1 mM EDTA), l'ADN génomique des souches de mycobactéries, des souches isolées de la Seine et du soucier de référence ajouté au soucier non spécifique, a été extrait par choc thermique à +80°C pendant 1h pour les mycobactéries et à +95°C pendant 10 min pour les souches non mycobactériennes. Après centrifugation à 16000 xg pendant 10 min, le surnageant a été récupéré et dosé à 260 nm par un spectrophotomètre Ultrospec 3000 pro. La concentration en ADN de ce surnageant a été normalisé à 100 µg/ml dans du TE à 1X.

- Vérification des inhibiteurs de PCR

Afin d'éliminer des hypothèses sur la présence de molécules inhibitrices de PCR dans ces surnageants, il a été recherché par PCR la présence de gènes liés à l'opéron *rrs*, en utilisant des amorces universelles. Chez les bactéries le gène de l'ARNr 16S a été amplifié via le couple d'amorce du domaine Bacteria 8F/1512R [150], et chez champignons microscopiques le gène de l'ARNr 5.8S a été amplifié via le couple d'amorce universel des champignons microscopiques ITS1/ITS4 [151-154]. Une amplification positive de ces gènes témoigne d'une bonne qualité de l'ADN et de l'absence d'inhibiteurs de PCR.

- Condition de PCR

Les PCR de vérification de l'absence d'inhibition de PCR et de recherche d'amplification, ont été réalisées dans les mêmes conditions réactionnelles et suivant les cycles d'amplification décrits par les auteurs. Dans un thermocycler Biometra® T1 (Labgene), 2 µl des extraits d'ADN normalisé à 100 µg/ml ont été utilisés dans 23 µl de mix-PCR ; constitué de 13,9 µl d'eau ultra pure ; 5 µl de tampon 5X ; 1,5 µl de MgCl₂ à 25 mM ; 0,5 µl de dNTP à 10 mM ; 1 µl d'amorce sens et anti-sens à 20 µM et 0,1 µl de polymérase Gotaq®Flexi (Promega). Les amplifications PCR ont été observées par électrophorèse de 3 µl d'ADN additionné de 3 µl de LS (Loading Solution) à 2X (sucrose à 20% ; Tris HCl à 10 mM, SDS à 0,2% ; EDTA à 1 mM), sur un gel à 1% d'agarose LE (Roche), préparé dans du TBE à 1X (Tris 10 mM ; acide Borique 89 mM ; EthylèneDiamine-Tétracétique 2 mM pH 8,0) additionné de BET (Bromure d'Ethidium) à hauteur 6 mg/ml de gel. L'observation sous UV a fait intervenir une caméra High Performance CCD (Charge-Coupled Device) Imaging System, munie du logiciel The Imager™ (Appligene).

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Création d'un soucier isolé de la Seine

Sur les 50 germes isolés de la Seine aux ponts de Choisy et d'Ivry, et présentant des caractéristiques macroscopiques, microscopiques et physiologiques différentes, 47 sont des bactéries (Figure 11) et trois sont des champignons microscopiques dont l'identification exacte reste à confirmer. Concernant les bactéries, la comparaison de l'ensemble des séquences d'ARNr 16S, a permis de confirmer l'appartenance des souches isolées de la Seine, majoritairement aux *phylum* γ -Proteobacteria, Actinobacteria et Firmicutes, et minoritairement aux *phylum* Bacteroides et α -Proteobacteria (Figure 11).

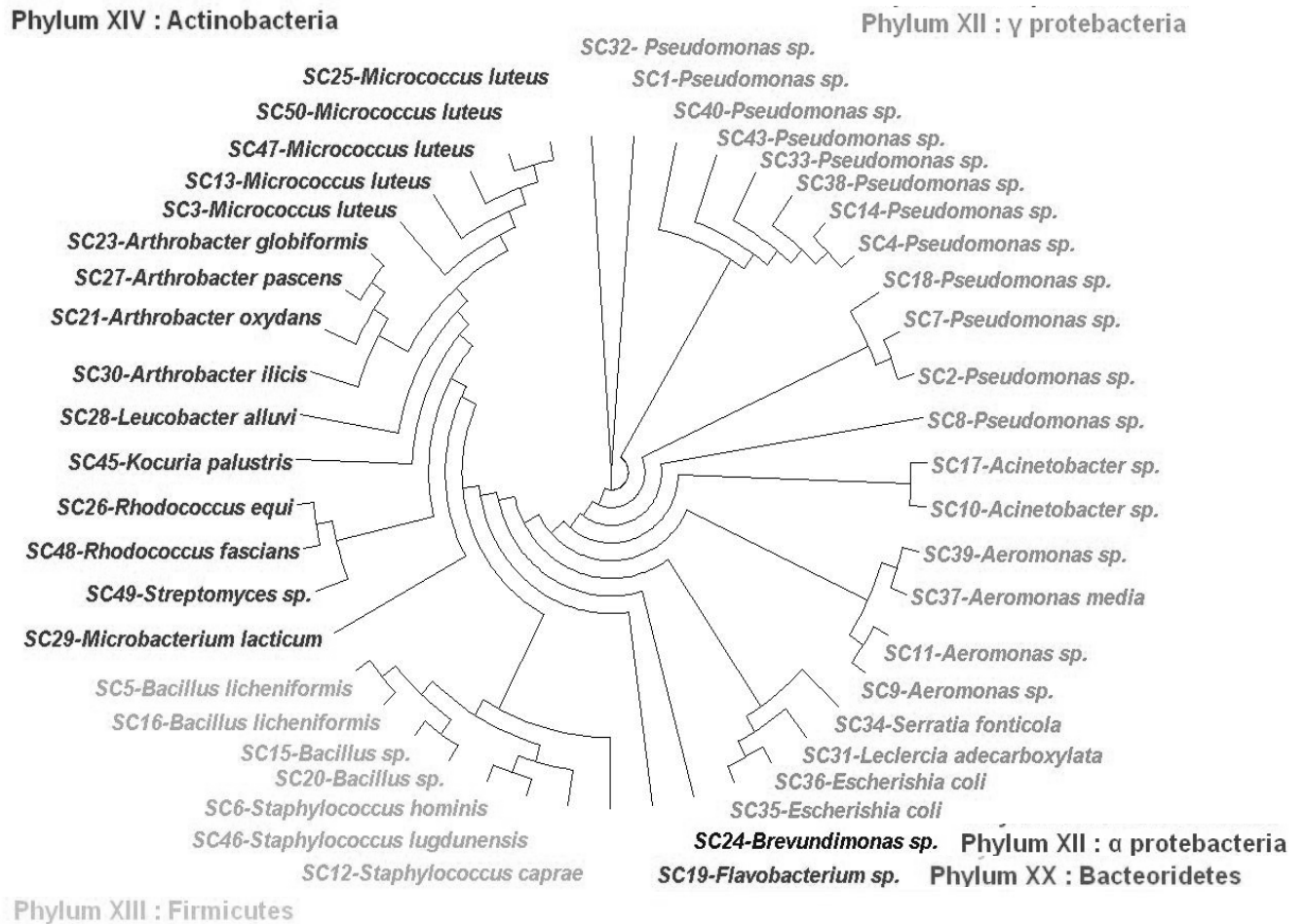


Figure 11 : Dendrogramme Neighbor Joining de comparaison de 500 pb de l'ARNr 16S, chez des bactéries isolées de l'eau de la Seine au niveau des ponts de Choisy et d'Ivry et présentant des caractéristiques microscopiques, macroscopiques et physiologiques différentes

Semi-qualitativement (Figure 12), les eaux de Seine des ponts de Choisy et Ivry ont une composition en microorganismes ressemblante. A ces deux points de prélèvement, il a été isolé des *Pseudomonas* (24% du soucier), des *Micrococcus* (10% du soucier), des *Bacillus* (10% du soucier), des *Arthrobacter* (8% du soucier), des *Aeromonas* (8% du soucier), des *Staphylococcus* (6% du soucier), des moisissures (6% du soucier), des *Acinetobacter* (4% du soucier) et des *Rhodococcus* (4% du soucier). Néanmoins, quelques différences sont à noter, comme la présence des genres *Serratia*, *Leclercia*, *Kocuria*, *Escherishia* et *Brevundimonas* uniquement isolés en faible proportion du pont de Choisy (2% du soucier pour chaque genre), et les genres *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Leucobacter* et *Flavobacterium* uniquement isolés en faible proportion du pont d'Ivry (2% du soucier pour chaque genre).

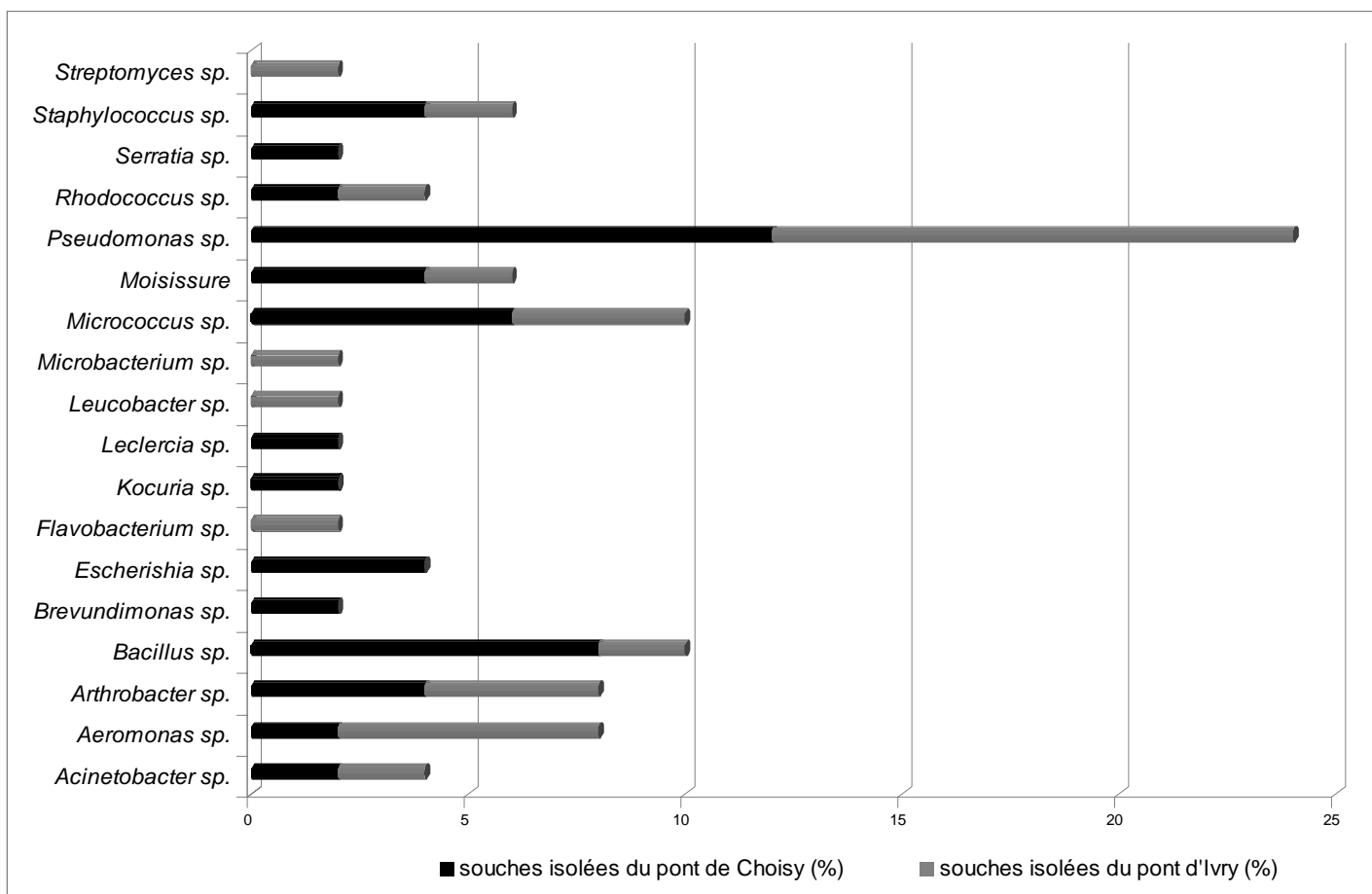


Figure 12 : Proportions relative des microorganismes du soucier de cinquante germes isolés de l'eau de la Seine au niveau du pont de Choisy et du pont d'Ivry, et présentant des caractéristiques macroscopiques, microscopiques et physiologiques différentes

3.3.2 Spécificité des amorces

Après recherche de l'ARNr 16S pour les bactéries ou de l'ARNr 5.8S chez les champignons microscopiques, et en comparaison aux témoins positifs (*M. avium* ATCC 25291 et *M. goodii* ATCC 14470), les recherches d'amplifications par les couples d'amorces gyrB/gyrE ; Z261/Z212 ; SodF/SodR ; F246/R266267 ; MycF/MycR ; b11/Tb12 ; 110F/I571R et F119/R184 ont permis de calculer la spécificité de ces couples, respectivement de 0,00% ; de 18,18% ; de 45,10% ; de 56,90% ; de 79,31% ; de 93,10% et de 94,83% (Tableau 2). Le couple d'amorce le plus spécifique F119/R184 [141], a permis d'amplifier fortement chez *Rhodococcus equi*, *Nocardia cerraensis*, et *Nocardia cunmideiens*, une région présentant une taille semblable à la région cible du gène *gyrB* chez les mycobactéries. Le second couple le plus spécifique 110F/I571R, a permis d'amplifier faiblement des régions de taille semblables à celles des mycobactéries chez un *Bacillus*, un *Flavobacterium*, un *Aeromonas media* et *Corynebacterium pseudopythemicum*.

Tableau 2 : Résultats de l'étude de spécificité aux mycobactéries de couples d'amorces utilisés pour amplifier par PCR de régions des gènes *sodA*, *gyrB* et *rrs* chez des souches isolées de la Seine et des souches proches des mycobactéries

	Amplification de <i>gyrB</i> (gyrBA/gyrBE)	Amplification de <i>sodA</i> (Z261/Z212)	Amplification de <i>sodA</i> (F246/R266267)	Amplification de l'ARNr 16S (F246/R266267)	Amplification de l'ARNr 16S (MycF/MycR)	Amplification de <i>hsp 65</i> (Tb11/Tb12)	Amplification de l'ARNr 16S (110F/I571R)	Amplification de <i>gyrB</i> (F119/R184)
nombre d'amplification faible (+)	1	23	17	25	13	3	3	0
nombre d'amplification forte (+++)	57	22	11	8	12	9	1	3
nombre d'amplification positive (pos)	58	45	28	33	25	12	4	3
nombre d'amplification négatives (nég)	0	10	23	25	33	46	54	55
% de spécificité du couple d'amorce (100x nég)/(pos+nég)	0,00	18,18	41,38	43,10	56,90	79,31	93,10	94,83

4 Perspectives

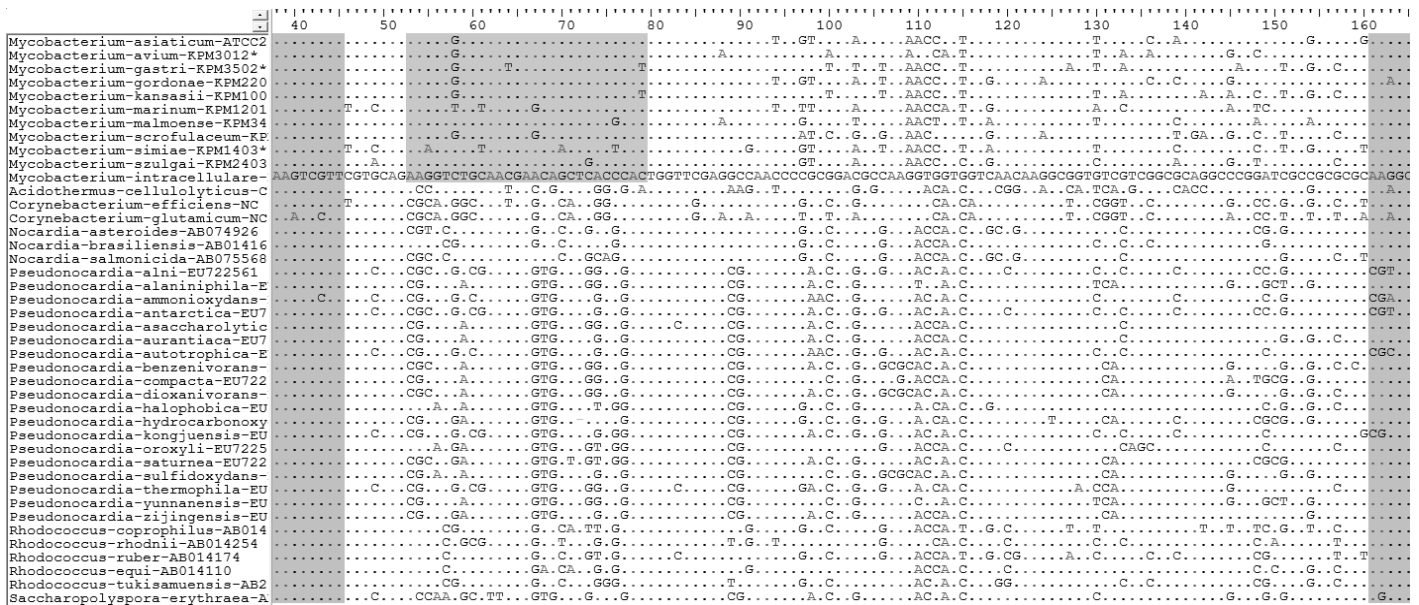
4.1 Bactériologie

La combinaison de la concentration par centrifugation, de l'utilisation des antibiotiques PANTAV dans le milieu de culture 7H11j, et de la méthode de décontamination chimique de Tacquet-Tison, semble être la meilleure pour isoler et quantifier par bactériologie les MNT de l'eau de surface. Néanmoins, en raison des microorganismes de contamination et notamment des moisissures, il n'a été possible que d'isoler des MNT à croissance lente. A ce sujet, une méthode d'élimination de ces microorganismes à formes sporulée est à l'étude. Une norme en milieu aqueux de quantification des MNT qui fait défaut et qui est notamment demandé par des professionnels comme l'hôpital Charles-Foix (E. Cambau) et des usines de potabilisation (Veolia environnement), pourra par la suite être proposée à l'AFNOR (Agence Française de Normalisation).

4.2 Biologie Moléculaire

4.2.1 Développement de méthode

Les deux amorces très spécifiques retenues seront utilisées pour tester deux PCR en temps réel de chimie TaqMan sur le souchier non spécifique et un souchier des MYC représentatif de la matrice aqueuse, qui est actuellement en culture (§ 1.4). Le couple 110F/I571R qui cible le gène *rrs*, ne nécessitera pas de le dessin d'une sonde car cette dernière a déjà été publiée pour des applications en milieu médical [134]. Il sera donc vérifié si cette sonde permet de ne pas détecter par chimie TaqMan le génome de *Bacillus*, de *Flavobacterium*, de *Aeromonas media* et de *Corynebacterium pseudodiphthericum*. Entre les amorces d'amplification PCR F119/R184, qui ciblent le gène *gyrB* [141], il sera hybridé une sonde dessinée, afin de ne pas amplifier le génome des bactéries *Rhodococcus equi* et *Nocardia* sp., qui ont été isolées de la Seine. Pour se faire des séquences de mycobactéries de cette zone du gène *gyrB* publiées précédemment [141], ont été alignées avec des séquences de germes non mycobactérien proches des mycobactéries, afin de définir une zone à la fois conservée chez ces mycobactéries et polymorphe chez ces germes non mycobactérien (Figure 13).



Données modifiées de Fukushima *et al.* [141]

Figure 13 : Alignement de séquences de mycobactéries et de genres apparentés et zone envisagée pour hybrider une sonde TaqMan (centrale) sur l'amplification partielle du gène *gyrB* via le couple d'amorces F119/R184 (droite et gauche)

4.2.2 Application sur le terrain

Dans l'objectif d'identifier les sources ponctuelles de MNT en Seine, différentes campagnes de prélèvement ont été envisagées et certaines ont été effectuées.

- Campagne réalisée

La méthode de PCR en temps réel présentant la meilleure sensibilité et spécificité, sera appliquée à des échantillons d'eau d'une campagne de prélèvement réalisée cette année au déversoir d'orage de Clichy, qui ont été conservés en congélation. Cette campagne a consisté à suivre la nappe de déversement unitaire dans la Seine engendrée par l'orage du 07/08/08. A cette date, il a été déversé 600 000 m³ en 6h d'eau ruisselante dans la Seine qui avait un débit de 200 m³/s. Pour cette campagne, il a été prélevé de l'eau de la nappe déversée en surface et en profondeur (environ 5 m). Cette nappe a été suivie pendant sa progression aval, via la mesure de la conductivité et de l'oxygène dissous, qui présentées des valeurs nettement inférieures à celles de la Seine. Trois points en surface et profondeur, ont été réalisés pour ce suivi de la nappe. De plus, un prélèvement en amont du rejet a été réalisé afin d'avoir un point de référence du temps sec. Le rejet à quant à lui était prélevé au cours du temps afin de réaliser un échantillon moyen reconstitué en fonction du débit de déversement avec un pas de temps de 5 min. Ainsi, il sera déterminé si les rejets de temps de pluie et une source ponctuelle de MNT. De plus, le devenir des MNT dans la nappe sera décrit concernant leur sédimentation potentielle.

- Campagnes en prévision

En 2009-2011, il sera effectué une campagne de prélèvement dans la Seine en amont et aval de rejet des stations d'épuration Parisienne (Seine amont, Seine centre, Seine aval, Grésillons) et à la confluence de la Seine avec la Marne et l'Oise en collaboration avec le SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne). De plus, il est aussi prévu d'effectuer des prélèvements dans la Seine en amont et aval de rejets hospitaliers avec la collaboration du CRECEP (Centre de Recherche d'Expertise et de Contrôle des Eaux de Paris). Il sera ainsi possibles d'évaluer si les rejets de stations d'épuration et les rejets d'hôpitaux sont des sources ponctuelles de MNT.

Références bibliographiques

1. Legrand, E., C. Sola, and N. Rastogi, *Le complexe Mycobacterium avium-intracellulare : marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces*. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 2000. **93**(3): p. 155-217.
2. Barksdale, L. and K.S. Kim, *Mycobacterium*. Bacteriological reviews, 1977. **41**(1): p. 217-372.
3. Cocito, C., et al., *Paratuberculosis*. Clinical Microbiology Reviews, 1994. **3**(7): p. 328-345.
4. Zhang, H., et al., *A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species*. Antonie van Leeuwenhoek, 2008. **93**(1): p. 241-248.
5. Lechevalier, H.A., *Bergey's Manual of Systematic and Bacteriology*. Williams and Wilkins, 1989. **4**.
6. Tortoli, E., *The newmycobacteria : an update*. FEMS Immunology Medical Microbiology, 2006. **48**(1): p. 159-178.
7. Griffith, D.E., T. Aksamit, and A. Brown-Elliott, *Treatment and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007. **175**(1): p. 367-417.
8. Horsburgh, C.R., *Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria*. Seminars in Respiratory Infections, 1996. **11**(1): p. 244-251.
9. Pedley, S., et al., *Pathogenic mycobacteria in wather*. World Health Organization titles with IWA Publishing, 2004. **1**(1): p. 1-229.
10. Ross, B.C., et al., *Detection of Mycobacterium ulcerans in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(10): p. 4135-4138.
11. Stinear, T., et al., *Identification of Mycobacterium ulcerans in the environment from regions in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(8): p. 3206-3213.
12. Williamson, H.R., et al., *Distribution of Mycobacterium ulcerans in Buruli Ulcer Endemic and Non-Endemic Aquatic Sites in Ghana*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2008. **2**(3): p. e205.
13. Dailoux, M., et al., *Water and nontuberculous mycobacteria*. Water Research, 1999. **33**(10): p. 2219-2228.
14. Zhang, Q., et al., *Pseudoepidemic due to a unique strain of Mycobacterium szulgai: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(4): p. 1134-1139.
15. Falkinham, J.O., *Mycobacterial aerosols and respiratory disease*. Emerging Infectious Diseases, 2003. **9**(7): p. 763-7.
16. Jussila, J., et al., *Mycobacterium terrae isolated from indoor air of a moisture-damaged building induces sustained biphasic inflammatory response in mouse lungs*. Environment Health Perspection, 2002. **110**(11): p. 1119-1125.
17. Khor, A., et al., *Diffuse pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in immunocompetent people (hot tub lung)*. American Journal of Clinical Pathology, 2001. **115**(5): p. 755-762.
18. Lumb, R., et al., *Investigation of Spa Pools Associated with Lung Disorders Caused by Mycobacterium avium Complex in Immunocompetent Adults*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(8): p. 4906-4910.
19. Marras, T.K., et al., *Hypersensitivity Pneumonitis Reaction to Mycobacterium avium in Household Water*. Chest, 2005. **127**(2): p. 664-671.
20. Primm, T., C.A. Lucero, and J.O. Falkinham, *Health Impacts of Environmental Mycobacteria*. Clinical Microbiology Reviews, 2004. **17**(1): p. 98-106.
21. Sood, A., et al., *Hypersensitivity Pneumonitis-like Granulomatous Lung Disease with Nontuberculous Mycobacteria from Exposure to Hot Water Aerosols*. Environmental health perspectives, 2007. **115**(2): p. 262-266.
22. Kahana, L.M. and J.M. Kay, *Pneumonitis due to Mycobacterium avium complex in hot tub water: infection or hypersensitivity*. Chest, 1997. **112**(6): p. 1713-1714.
23. Falkinham, J.O., *The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease*. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2003. **14**(5): p. 281-286.
24. Torkko, P., et al., *Characterization of Mycobacterium bohemicum isolated from human, veterinary, and environmental sources*. Journal of Clinical Microbiology, 2001. **39**(1): p. 207-211.
25. Gira, A., et al., *Furunculosis Due to Mycobacterium mageritense Associated with Footbaths at a Nail Salon*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(4): p. 1813-1817.

26. Sniezek, P.J., et al., *Rapidly Growing Mycobacterial Infections After Pedicures*. Archives for Dermatological Research, 2003. **139**(1): p. 629-634.
27. Vugia, D.J., et al., *Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California*. Emerging Infectious Diseases, 2005. **11**(4): p. 616-618.
28. Winthrop, K.L., et al., *An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon*. The New England journal of medicine, 2002. **346**(18): p. 1366-1371.
29. Cai, L., et al., *Identification of Mycobacterium marinum 65 kD heat shock protein gene by polymerase chain reaction restriction analysis from lesions of swimming pool granuloma*. Chinese Medical Journal, 2006. **119**(1): p. 43-48.
30. Cassetty, C.T. and M. Sanchez, *Mycobacterium marinum infection*. Dermatology online journal, 2004. **10**(3): p. 21.
31. Lindeboom, J.A., et al., *Cervicofacial lymphadenitis in childre caused by Mycobacterium haemophilum*. The Infectious Diseases Society of America, 2005. **41**(1): p. 1569-1575.
32. Tortoli, E., et al., *Mycobacterium tusciae sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1999. **49**(4): p. 1839-1844.
33. Rajini, M., et al., *Postoperative infection of laparoscopic surgery wound due to Mycobacterium Chelonae*. Indian Journal of Medical Microbiology, 2007. **25**(2): p. 163-165.
34. Adékambi, T., et al., *Description of Mycobacterium conceptionense sp. nov., a Mycobacterium fortuitum group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(4): p. 1268-1273.
35. Pickup, R.W., et al., *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*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(4): p. 2130-2139.
36. Thorel, M.F., *Relationship between Mycobacterium avium, M. paratuberculosis and mycobacteria associated with Crohn's disease*. Annals de Recherches Vétérinaires, 1989. **20**(1): p. 417-429.
37. Dailloux, M., et al., *Mycobacterium xenopi and Drinking Water Biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(11): p. 6946-6948.
38. September, S.M., V.S. Brözel, and S.N. Venter, *Diversity of nontuberculoïd Mycobacterium species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(12): p. 7571-7573.
39. Hilborn, E.D., et al., *Persistence of Nontuberculous Mycobacteria in a Drinking Water System after Addition of Filtration Treatment*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(9): p. 5864-5869.
40. Vaerewijck, M.J.M., et al., *Mycobacteria in drinking water distribution systems; ecology and significance for human health*. FEMS Microbiology Reviews, 2005. **29**(1): p. 911-934.
41. Torvinen, E., et al., *Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(4): p. 1973-1981.
42. Le Dantec, C., et al., *Occurence of Mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(11): p. 5318-5325.
43. Iivanainen, E.K., et al., *Environmental Factors Affecting the Occurrence of Mycobacteria in Brook Waters*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(2): p. 398-404.
44. Pickup, R.W., et al., *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*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(6): p. 4067-4077.
45. Chilima, B.Z., et al., *Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(4): p. 2343-2350.
46. Bland, C.S., et al., *Mycobacterial Ecology of the Rio Grande*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(10): p. 5719-5727.
47. Trujillo, M., et al., *Mycobacterium psychrotolerans sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004. **54**(DOI 10.1099/ijs.0.02938-0): p. 1459-1463.
48. Santos, R., et al., *Mycobacterium parascrofulaceum in Acidic Hot Springs in Yellowstone National Park*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(15): p. 5071-5073.
49. Covert, T.C., et al., *Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(6): p. 2492-2496.

50. Chang, C.T., et al., *Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(6): p. 3159-3161.
51. Lagunas-Solar, M.C., et al., *Disinfection of Dairy and Animal Farm Wastewater with Radiofrequency Power*. Journal of American Dairy Science Association, 2005. **88**(1): p. 4120-4131.
52. Whan, L., et al., *Occurrence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Untreated Water in Northern Ireland*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(11): p. 7107-7112.
53. Kahana, L.M., et al., *Mycobacterium avium complex infection in an immunocompetent young adult related to hot tub exposure*. Chest, 1997. **111**(1): p. 242-245.
54. Gomila, M., A. Ramirez, and J. Lalucat, *Diversity of environmental Mycobacterium isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(12): p. 3787-3797.
55. Walker, J.T., et al., *Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(8): p. 3363-3367.
56. Angenent, L.T., et al., *Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(13): p. 4860-4865.
57. Tokars, J.I., et al., *Mycobacterium gordonae pseudoinfection associated with a contaminated antimicrobial solution*. Journal of Clinical Microbiology, 1990. **28**(12): p. 2765-2769.
58. Wallace, J.R.J.J., et al., *Presence of a single genotype of the newly described species Mycobacterium immunogenum in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(11): p. 5580-5584.
59. Vuorio, R., et al., *A new rapidly growing mycobacterial species, Mycobacterium murale sp. nov., isolated from the indoor walls of a children's day care centre*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999. **49**(1): p. 25-35.
60. Kamala, T., et al., *Evaluation of Procedures for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Soil and Water*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(3).
61. Neumann, M., et al., *Comparison of Methods for Isolation of Mycobacteria from Water*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(2): p. 547-552.
62. Parashar, D., et al., *Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(6): p. 3751-3753.
63. Betelli, L., et al., *Détection des mycobactéries non tuberculeuses dans les environnements aquatiques urbains*. Rapport de stage Master recherche, 2008. **1**(1): p. 1-58.
64. Lucas, F., et al., *Bactéries du sédiment: extraction et distribution sur un estran (Baie du Mont St Michel)*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 1996. **3**(319): p. 537-542.
65. Carson, L.A., et al., *Efficacy of Chemical Dosing Methods for Isolating Nontuberculous Mycobacteria from Water Supplies of Dialysis Centers*. Applied and Environmental Microbiology, 1988. **54**(7): p. 1756-1760.
66. de Juan, L., et al., *Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains isolated from cattle and goats*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(9): p. 5927-5932.
67. Donaghy, J.A., N.L. Totton, and M.T. Rowe, *Evaluation of culture media for the recovery of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from Cheddar cheese*. Letters in Applied Microbiology, 2003. **37**(doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01392.x): p. 285-291.
68. Sung, N. and M.T. Collins, *Variation in Resistance of Mycobacterium paratuberculosis to Acid Environments as a Function of Culture Medium*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(11): p. 6833-6840.
69. Sung, N., K. Takayama, and M.T. Collins, *Possible Association of GroES and Antigen 85 Proteins with Heat Resistance of Mycobacterium paratuberculosis*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(3): p. 1688-1697.
70. Whittington, R.J., et al., *Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from sheep*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(4): p. 1077-1083.
71. Cage, G.D., *Direct Identification of Mycobacterium Species in BACTEC 7H12B Medium by High-Performance Liquid Chromatography*. Journal of Clinical Microbiology, 1994. **32**(2): p. 521-524.
72. Anargyros, P., D.S.J. Astill, and I.S.L. Lim, *Comparison of Improved BACTEC and Lowenstein-Jensen Media for Culture of Mycobacteria from Clinical Specimens*. Journal of Microbiology, 1990. **28**(6): p. 1288-1291.

73. Brunello, F., F. Favari, and R. Fontana, *Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Various Clinical Specimens*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(4): p. 1206-1209.
74. Conville, P.S., J.W. Andrews, and F.G. Witebsky, *Effect of PANTA on growth of Mycobacterium kansasii in BACTEC 12B medium*. Journal of Clinical Microbiology, 1995. **33**(8): p. 2012-2013.
75. Leitritz, L., et al., *Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens of a University Hospital with Low Incidence of Tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology, 2001. **39**(10): p. 3764-3767.
76. Realini, L., et al., *Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of Mycobacterium genavense in BACTEC primary cultures*. Journal of Clinical Microbiology, 1997. **35**(11): p. 2791-2794.
77. Stager, C.E., et al., *Role of Solid Media When Used in Conjunction with the BACTEC System for Mycobacterial Isolation and Identification*. Journal of Clinical Microbiology, 1991. **29**(1): p. 154-157.
78. Carbonnelle, B., et al., *Nouvelle technique de détection des mycobactéries: utilisation de l'automate Bactec 9240 TB* Revue Française des Laboratoires, 1996. **1996**(282): p. 125-128.
79. Collins, M.T., et al., *Enhanced radiometric detection of Mycobacterium paratuberculosis by using filter-concentrated bovine fecal specimens*. Journal of Clinical Microbiology, 1990. **28**(11): p. 2514-2519.
80. Ambrosio, S.R., E.M.D. Oliveira, and C.A.R. Roriguez, *Comparison of three decontamination methods for Mycobacterium bovis isolation*. Brazilian Journal of Microbiology, 2008. **39**(2): p. 241-244.
81. Ezold, R., et al., *Comparative studies on mersolat and sulfuric acid preparation of tissue, milk, feces and gastric juice with special reference to Mycobacterium bovis*. Zeitschrift für Tuberkulose und Erkrankungen der Thoraxorgane, 1968. **129**(3): p. 157-166.
82. Mitchison, A. and V.R. Aber, *Culture of specimens other than sputum for Mycobacteria*. Journal of Clinical Pathology, 1974. **27**(11): p. 883-887.
83. Thorel, M.F. and H. Boisvert, *Action de l'acide sulfurique à 4 p. cent sur les diverses espèces de mycobactéries*. Annales de Biologie Clinique, 1976. **34**(1): p. 431-435.
84. Petroff, S.A., *A new and rapid method for the isolation and cultivation of the tubercle bacillus directly from sputum and feces*. Journal of Experimental Medecin, 1915. **XXI**: p. 38.
85. Kunst, H., et al., *Nontuberculous mycobacterial disease and Aspergillus-related lung disease in bronchiectasis*. European Respiratory Journal, 2006. **28**(1): p. 352-357.
86. Salem, J.I., et al., *PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum*. Acta Amazonica, 2007. **37**(3): p. 419-424.
87. Wang, S.X., L.H. Sng, and L. Tay, *Preliminary study on rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by the BD ProbeTec ET system*. Journal of Medical Microbiology, 2004. **53**(1): p. 57-59.
88. Palomino, J.C. and F. Portaels, *Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of Mycobacterium ulcerans in the BACTEC system*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. **36**(2): p. 402-408.
89. Tacquet, A. and F. Tison, *Nouvelle technique d'isolement des mycobacteries par le lauryl sulfate de sodium*. Annales de L'Institut Pasteur, 1961. **100**: p. 676-680.
90. Tacquet, A. and F. Tison, *L'utilisation des détergents pour l'isolement des mycobacteries*. Bulletin of the International Union against Tuberculosis, 1966. **38**(1): p. 59-67.
91. Álvarez, J., et al., *Genetic Diversity of Mycobacterium avium Isolates Recovered from Clinical Samples and from the Environment: Molecular Characterization for Diagnostic Purposes*. Journal of Clinical Microbiology, 2008. **46**(4): p. 1246-1251.
92. Doucet-Populaire, F., et al., *A blind study of the polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium tuberculosis DNA* Tubercle and Lung Disease, 1996. **77**(4): p. 358-362.
93. Narasimhan, R., G.P. Mathur, and S.P. Pamra, *Sodium lauryl sulphate method of culturing sputum for Mycobacterium tuberculosis*. Indian Journal of Tuberculosis, 1972. **XIX**(4).
94. Ruiz-Manzano, J., et al., *Detection of Mycobacterium tuberculosis in Paraffin-Embedded Pleural Biopsy Specimens by Commercial Ribosomal RNA and DNA Amplification Kits*. Chest, 2008. **118**(1): p. 648-655.
95. Kubica, G.P., A.J. Kaufmann, and W.E. Dye, *Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria*. American Revue of Respiratory Diseases 1964. **87**(1): p. 775-779.

96. Thornton, C.G., et al., *In Vitro Comparison of NALC-NaOH, Tween 80, and C18 Carboxypropylbetaine for Processing of Specimens for Recovery of Mycobacteria*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. **36**(12): p. 3558-3566.
97. Yajko, D.M., et al., *Comparison of four decontamination methods for recovery of Mycobacterium avium complex from stools*. Journal of Clinical Microbiology, 1993. **31**(2): p. 302-306.
98. Bange, F.C. and E. Böttger, *Improved Decontamination Method for Recovering Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002. **21**(DOI 10.1007/s10096-002-0760-y): p. 546-548.
99. Bange, F.C., P. Kirschner, and E.C. Böttger, *Recovery of Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(11): p. 3761-3763.
100. Whittier, S., et al., *Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis*. Journal of Clinical Microbiology, 1993. **31**(4): p. 861-864.
101. Schulze-Röbbecke, R., A. Weber, and R. Fischeder, *Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples*. Journal of Microbiological Methods, 1991. **14**(3): p. 177-183.
102. Norton, C.D., M.W. LeChevallier, and J.O. Falkinham, *Survival of Mycobacterium avium in a model distribution system*. Water Research, 2004. **38**(1): p. 1457-1466.
103. Thomson, R., et al., *Comparison of Methods for Processing Drinking Water Samples for the Isolation of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(10): p. 3094-3098.
104. Tsintzou, A., et al., *Environmental Mycobacteria in Drinking Water Before and After Replacement of the Water Distribution Network*. Water, Air and Soil Pollution, 2000. **120**(1): p. 273-282.
105. Vantarakis, A., et al., *Non Tuberculosis Mycobacteria in hospital water supplies*. Water, Air, and Soil Pollution, 1998. **104**(1): p. 331-337.
106. Ben-Dov, E., et al., *Advantage of Using Inosine at the 3' Termini of 16S rRNA Gene Universal Primers for the Study of Microbial Diversity*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(11): p. 6902-6906.
107. Kim, H.Y., et al., *Outbreak of Mycobacterium massiliense Infection Associated with Intramuscular Injections*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(9): p. 3127-3130.
108. Tsukamura, M., H.J. van der Meulen, and W.O.K. Grabow, *Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria of the Mycobacterium parafortuitum complex: Mycobacterium austroafricanum sp. nov. and Mycobacterium diernhoferi sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1983. **1983**(33): p. 1.
109. Ferreira, N.L., et al., *Isolation and characterization of a new Mycobacterium austroafricanum strain, IFP 2015, growing on MTBE*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **70**(1): p. 658-365.
110. François, A., et al., *Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether and Other Fuel Oxygenates by a New Strain, Mycobacterium austroafricanum IFP 2012* Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(6): p. 2754-2762.
111. van der Heijden, I.M., et al., *Detection of mycobacteria in joint samples from patients with arthritis using a genus-specific polymerase chain reaction and sequence analysis*. Rheumatology, 1999. **38**(1): p. 547-553.
112. Tsukamura, M., H. Nemoto, and H. Yugi, *Mycobacterium porcinum sp. nov., a porcine pathogen*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983. **33**(2): p. 162-165.
113. Idigoras, P.P., J.A. Jiménez-Alfaro, and J. Mendiola, *Osteomyelitis esternal posquirúrgica por Mycobacterium porcinum*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2007. **25**(1): p. 68-69.
114. Wallace, R.J., et al., *Clinical and Laboratory Features of Mycobacterium porcinum*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(12): p. 5689-5697.
115. Cloud, J.L., et al., *Mycobacterium arupense sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006. **56**(DOI 10.1099/ijs.0.64194-0): p. 1413-1418.
116. Tsai, T.F., et al., *Tenosynovitis Caused by Mycobacterium arupense in a Patient with Diabetes Mellitus*. Clinical Infectious Diseases 2008; , 2008. **47**(1): p. 861-863.
117. Gomila, M., et al., *Mycobacterium llatzerense sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water*. international Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008. **58**(DOI 10.1099/ijs.0.65857-0): p. 2769-2773.
118. Trujillo, M.E., et al., *Mycobacterium psychrotolerans sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine*. international Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004. **54**(DOI 10.1099/ijs.0.02938-0): p. 1459-1463.

119. Lamy, B., et al., *Mycobacterium setense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum*-group organism isolated from a patient with soft tissue infection and osteitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008. **58**(DOI 10.1099/ijs.0.65222-0): p. 486-490.
120. Toro, A., et al., *Mycobacterium setense* infection in Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 2008. **14**(8): p. 1330-1332.
121. Brooks, R.W., et al., *Recovery and survival of nontuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1984. **30**(1): p. 1112-1117.
122. Tobler, N.E., et al., *Rapid detection and species identification of Mycobacterium spp. using real-time PCR and DNA-Microarray*. *Journal of Microbiological Methods*, 2006. **66**(1): p. 116-124.
123. Adékambi, T. and M. Drancourt, *Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004. **54**(DOI 10.1099/ijs.0.63094-0): p. 2095-2105.
124. Domenech, P., et al., *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997. **47**(2).
125. Zolg, J.W. and S. Philippi-Schulz, *The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994. **32**(11): p. 2801-2812.
126. Bannalikal, A.S. and R. Verma, *Detection of Mycobacterium avium & M. tuberculosis from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR*. *Indian Journal of Medical Research*, 2006. **123**(1): p. 165-172.
127. Blackwood, K.S., et al., *Evaluation of recA sequences for identification of Mycobacterium species*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000. **38**(8): p. 2846-2852.
128. Cheunoy, W., et al., *Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: Two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005. **51**(1): p. 165-171.
129. Kim, B.J., et al., *Differential identification of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (rpoB)*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004. **42**(3): p. 1308-1312.
130. Mokaddas, E. and S. Ahmad, *Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex members from non tuberculous mycobacteria*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2007. **60**(1): p. 140-144.
131. Böddinghaus, B., et al., *Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990. **28**(8): p. 1751-1759.
132. Cook, V.J., et al., *Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. **41**(3): p. 1010-1015.
133. Dobner, P., et al., *Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996. **34**(4): p. 866-869.
134. Garcia-Quintanilla, A., et al., *Simultaneous identification of Mycobacterium genus and Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002. **40**(12): p. 4646-4651.
135. Kirschner, P., et al., *Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993. **31**(11): p. 2882-2889.
136. Mendum, T.A., B.Z. Chilima, and P.R. Hirsch, *The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil*. *FEMS Microbiology letters*, 2000. **185**(2): p. 189-192.
137. Shrestha, N.K., et al., *Detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis and non tuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. **41**(11): p. 5121-5126.
138. Turenne, C.Y., et al., *Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001. **40**(6): p. 3637-3648.
139. Wu, X., et al., *Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007. **45**(6): p. 1898-1903.

140. Dauendorffer, J.N., et al., *Identification of Mycobacterial species by PCR sequencing of Quinolone Resistance-Determining Regions of DNA gyrase genes*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(3): p. 1311-1315.
141. Fukushima, M., et al., *Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(6): p. 2605-15.
142. McNabb, A., et al., *Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of Mycobacterium species isolated from clinical sources*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(7): p. 3000-3011.
143. Oliveira, R.S., et al., *Identification of Mycobacterium avium genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-based Restriction Fragment Length Polymorphism and restriction analysis of hsp65*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(1): p. 44-49.
144. Prammananan, T., et al., *Distribution of hsp65 PCR-restriction enzyme analysis patterns among Mycobacterium avium complex isolates in Thailand*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(10): p. 3819-3821.
145. Smole, S.C., et al., *Clinical and Epidemiological Correlates of Genotypes within the Mycobacterium avium Complex Defined by Restriction and Sequence Analysis of hsp65*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(9): p. 3374-3380.
146. Swanson, D.S., et al., *Subspecific differentiation of Mycobacterium avium complex strains by automated sequencing of a region of the gene (hsp65) encoding a 65-Kilodalton Heat Shock Protein*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997. **47**(2): p. 414-419.
147. Telenti, A., et al., *Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis*. Journal of Clinical Microbiology, 1993. **32**(2): p. 175-178.
148. Turenne, C.Y., et al., *Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the Mycobacterium avium complex*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(2): p. 433-440.
149. Yzquierdo, S.S.L., et al., *Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas*. Microbiología Clínica, 2007. **24**(5): p. 391-396.
150. Felske, A., et al., *Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils*. Microbiology, 1997. **143**(1): p. 2983-2989.
151. Kumar, M. and P.K. Shukla, *Use of PCR Targeting of Internal Transcribed Spacer Regions and Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis of Sequence Variation in Different Regions of rRNA Genes in Fungi for Rapid Diagnosis of Mycotic Keratitis*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(2): p. 662-668.
152. Shi, A. and M.T. Mmbaga, *Perpetuation of Powdery Mildew Infection and Identification of Erysiphe australiana as the Grape Myrtle Pathogen in Mid-Tennessee*. Plant Disease, 2006. **90**(8): p. 1094-1098.
153. Takamatsu, S. and Y. Kano, *PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi*. Mycoscience, 2001. **42**(1): p. 135-139.
154. White, T.J., et al., *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications., 1990: p. 315-322.
155. Rocher, V., et al., *La biofiltration des eaux usées : comparatif technique et économique de différentes configurations de traitement*. La Houille Blanche, 2007. **10.1051/lhb:2007013**(1): p. 95-102.