

Action. Mycobactéries non tuberculeuses

F. Lucas¹, L. Moulin², S. Haenn², L. Desforges³, E. Cambau³

¹ Cereve, Université Paris 12-Val de Marne, 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 CRETEIL : lucas@univ-paris12.fr,

² Crecep, Etude biologie, 144 Avenue Paul Vaillant Couturier, 75014 PARIS : laurent.moulin@crecep.fr, sophie.haenn@crecep.fr

³ Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, Laboratoire de bactériologie et virologie, CHU Henri Mondor, 94010 CRETEIL: emmanuelle.cambau@hmn.ap-hop-paris.fr, lionel.deforges@hmn.ap-hop-paris.fr

PIREN Rapport actionMNT.doc

1. Introduction.....	1
2. Les mycobactéries non-tuberculeuses.....	2
2.1. Diversité.....	3
2.2. Impact sur la santé humaine	4
2.3. Sources et réservoirs	6
3. Méthodes de recherche de mycobactérie dans les eaux.....	8
3.1. Méthodes indirectes.....	8
3.2. Méthodes directes	10
4. Action 2007.....	11
4.1. Objectifs.....	11
4.2. Matériel et méthodes	12
4.3. Résultats et discussion	13
5. Conclusion	17
6. Perspectives.....	18
7. Bibliographie.....	18

1. Introduction

Les mycobactéries constituent un large groupe taxonomique distribué dans divers environnements aquatiques et terrestres. La plupart sont des saprophytes mais certaines espèces sont des pathogènes capables d'infecter les humains et les animaux . Ainsi le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* and *M. canetti*) et *M. Leprae*, sont les agents respectifs de la tuberculose et de la lèpre. A côté des ces pathogènes à l'impact significatif sur la santé humaine, les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) également appelées mycobactéries atypiques, ou mycobactéries environnementales pathogéniques (PEM) ou mycobactéries autres que tuberculeuses (MOTT), ont reçu moins d'attention. Cependant les MNT peuvent également être la cause fréquente d'infections localisées (peau, ganglions lymphatiques, os, poumons, tissus mous) ou disséminées dans tout le corps (Dailloux et al. 1999). Bien que les industriels de l'eau soient peu familiers avec ces pathogènes, de nombreux cas montrent que l'eau joue un rôle significatif dans la transmission des MNT (Wallace et al. 1998). L'importance des infections

par les MNT et en particulier par le complexe *Mycobacterium avium* (MAC) a été reconnue avec la découverte d'infections disséminées chez les personnes immunodéprimées, en particulier chez les patients atteints du SIDA. Désormais, l'Organisation Mondiale de la Santé les reconnaît comme pathogènes émergents. (Pedley et al., 2004). Or les routes de transmission, les sources et les réservoirs de MNT dans l'environnement sont encore mal élucidés. Par ailleurs ces bactéries à la paroi épaisse et riche en lipides sont particulièrement résistantes aux traitements de désinfections classiques et ont tendance à former des biofilms. Il est donc extrêmement important de comprendre les conditions écologiques qui contribuent à la prolifération et la persistance des MNT dans les milieux aquatiques (Bland et al. 2005). Nous devons également développer et préciser les méthodologies utilisées pour détecter les MNT dans l'environnement, pour étudier leur diversité et leur phylogénie, pour identifier des marqueurs de virulence et pour mettre en place des stratégies de désinfection efficaces (Falkinham, 2004).

2. Les mycobactéries non-tuberculeuses

Les MNT sont de petits bacilles aérobie assez longs et fins, asporulés et acapsulés (

Figure 1. A). Elles appartiennent au groupe des actinobactéries, bactéries à Gram positif, avec un pourcentage en bases nucléiques G+C (guanidine et cytosine) élevé (

Figure 1.B). Chez les mycobactéries il est compris entre 61 et 71 %. Leur paroi présente une structure particulière, riche en acides mycoliques (cires) qui leur confère une résistance à l'action combinée d'acide dilué et d'alcool (acido-alcool-résistants) (Ziza et Desplaces, 2006). Cette paroi explique la grande résistance MNT aux macrophages, aux UV et au chlore. Leur temps de génération est extrêmement long, ils nécessitent donc quelques semaines à plusieurs mois de mise en culture pour les isoler de l'environnement (Stinear et al. 2004).

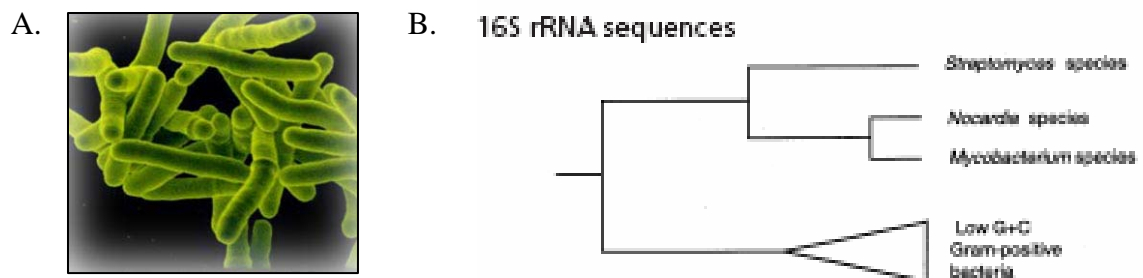


Figure 1. A *Mycobacterium* sp. observés en microscopie électronique (NIH, Clifton E. Barry). B. Comparaison phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S de bactéries à Gram positif. L'arbre montre les relations plutôt que les distances (Ahmad et al. 1999)

Les MNT sont largement distribuées dans les sols, sédiments, eau douce et estuaires. Les densités rapportées dans les environnements aquatiques naturels et artificiels varient de 1 à 10^5 UFC.l⁻¹ (Tableau 1). Cette grande variabilité provient à la fois des difficultés techniques à isoler les mycobactéries et des variations de densité en fonction de la région et des caractéristiques de l'échantillon.

Leur ubiquité est due à leur capacité à exploiter des niches écologiques inoccupées par d'autres microorganismes (Falkinham et al. 2004). Les mycobactéries sont capables d'utiliser

une variété d'hydrocarbures y compris les hydrocarbures aromatiques et polycycliques saturés ou insaturés présent dans les environnements contaminés (Niva et al. 2006).

Bland et al (2005) ont montré que les conditions extrêmes comme les écosystèmes acides ou les eaux alcalines du Rio Grande favorisent les MNT. Les densités de *M. avium* sont plus élevées dans les eaux peu oxygénées et riches en matière organique (Falkinham et al. 2004).

Tableau 1. Densités (UFC.l⁻¹) de mycobactéries dans divers environnements aquatiques (liste non exhaustive)

Mycobactéries	Echantillon	Pays	10 ³ UFC.l ⁻¹	Référence
Mycobactéries	Eau naturelle	Finlande	0,97-5.8	Torkko et al. 2001
Mycobactéries	Brook waters	Finlande	0,01-2.2	Ilvanianen et al. 1993
MAC	Spa piscines	Australie	1-43	Lumb et al. 2004
MNT	Réseau d'eau potable	synthèse	0,001-3.5	Vaerewijck et al. 2005
Mycobactéries	Nappe phréatique et eau traitée	France	1-500	Le Dantec et al. 2002
Mycobactéries	Réseau d'eau potable	Finlande	0,001-1	Torvinen et al. 2004
MNT	Réseau d'eau potable	USA	0,002-1	Hilborn 2006

La capacité des MNT à croître à de faible niveau d'oxygène (microaérophilie) et la stimulation de leur croissance par les acides humiques et fulviques peut expliquer leur présence dans les sols humides et sédiments (Falkinham et al. 2004, Pickup et al. 2005). Les mycobactéries sont robustes et peuvent survivre des années dans les dépôts sédimentaires (Pickup et al. 2005). L'hydrophobicité de leur paroi cellulaire confère aux mycobactérie la capacité à produire et à vivre en biofilm dans les environnements aquatiques (Falkinham et al. 2004). Cette hydrophobicité contribue à la concentration des MNT dans les aérosols et aux interfaces air/eau où les MNT trouvent des conditions riches en matière organique et sans compétiteurs.

2.1. Diversité

Mycobactéries non-tuberculeuses est un terme collectif désignant les espèces du genre *Mycobacterium* qui n'appartiennent pas au complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Ce terme recouvre donc un groupe hétérogène d'espèces présentant une grande diversité. Le nombre d'espèces MNT identifiées et cataloguées est passé de 50 en 1997 à 125 en 2007 grâce à l'amélioration des techniques d'isolement et d'identification (Griffith et al. 2007). La Figure 2 donne un aperçu de la relation phylogénétique entre certaines de ces espèces. Sur la centaine d'espèces de mycobactéries identifiées, le nombre d'espèces pathogéniques pour les humains est passé de 21 en 2002 à 60 en 2004 (Mäkinen et al. 2002, Heifets 2004). Cette augmentation rapide est liée d'une part à l'amélioration des techniques d'isolement et d'identification, mais aussi à l'augmentation du nombre de cas d'infection par les MNT. Il est fort à parier que d'autres espèces pathogéniques et non-pathogéniques vont être découvertes dans les années à venir alors que plus d'attention est portée aux MNT dans les échantillons cliniques et dans les échantillons de l'environnement (Nichols et al. 2004). En effet une proportion significative de MNT isolées de l'environnement n'appartient pas à des espèces mycobactériennes décrites (Pickup et al. 2005).

Des surveillances ont montré une grande hétérogénéité parmi les isolats cliniques et environnementaux au niveau spécifique et sub-spécifique. Ainsi plusieurs espèces peuvent être isolées d'un même échantillon d'eau naturelle (Niva et al. 2006, Bland 2005). Les

espèces mycobactériennes trouvées dans les environnements aquatiques ne sont pas seulement pathogéniques, mais aussi des espèces saprophytiques (Vaerewijck et al 2005). Ainsi *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. bohemicum*, *M. malmoense*, *M. intracellulare*, *M. terrae* et *M. xenopi* ont été isolées d'échantillon d'eau naturelle et d'eau récréationnelles (Dailloux et al). Or chez l'homme 95% des infections sont liées à *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum* et *M. marinum* (Ziza et Desplaces 2006).



Figure 2. Relation phylogénétique entre les séquences du gène *hsp65* de mycobactéries non tuberculeuses. L'arbre est construit avec la méthode neighbor-joining. La robustesse des branchements a été testée sur 100 répétitions par la méthode Bootstraps, seules les valeurs supérieures à 50% sont représentées (Ferdinand et al. 2004).

Il est clair que la taxonomie des MNT est encore en développement alors que de nouvelles souches sont isolées des patients et de l'environnement. Or le besoin d'identifier correctement les MNT devient important pour comprendre l'épidémiologie des maladies. Par ailleurs les traitements appliqués aux patients demande un diagnostic fiable basé sur l'identification précise des pathogènes car la sensibilité aux antibiotiques, et donc les traitements, varient selon les espèces mycobactériennes.

2.2. Impact sur la santé humaine

Le groupe des MNT se différencie des mycobactéries responsables de la tuberculose par l'absence de pouvoir pathogène spécifique. Dans le cas des mycobactérioses, maladies provoquées par les MNT, la maladie humaine est toujours acquise de l'environnement sans transmission interhumaine au contraire de la lèpre et de la tuberculose. Depuis quelques années 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 alors que celle de la tuberculose semble diminuer toutes proportions gardées (Figure 3).

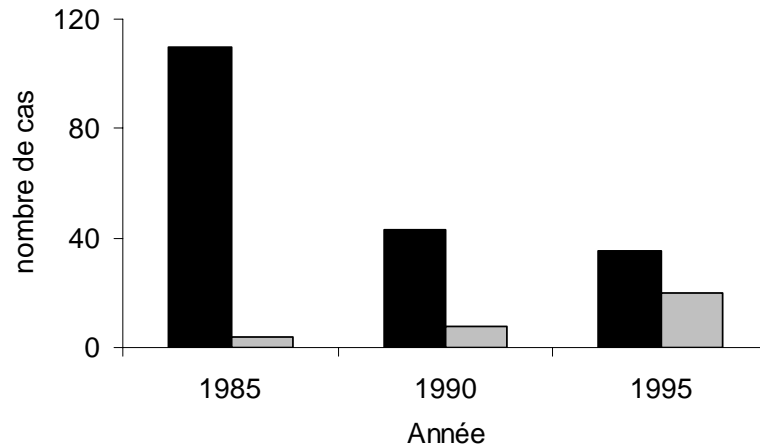


Figure 3. Nombre de cas de tuberculose et de mycobactérioses non-tuberculeuses au CHU de Nancy entre 1985 et 1995. Pendant cette période les méthodes de détection et le nombre total d'échantillons sont restés identiques (adapté de Dailloux et al 1999)

Cette augmentation est constatée alors que la vulnérabilité de la population devient plus importante, liée au vieillissement de la population, à l'utilisation accrue de thérapeutiques immunosuppressives et à l'apparition de l'épidémie du SIDA (Ziza et Desplaces 2006). Des changements récents de comportements et de vulnérabilité des humains sont donc en grande partie responsable de l'émergence des MNT. Ainsi les bains de pieds dans des instituts de beauté, et la pratique du piercing ont été à l'origine d'infections par des MNT (Pedley et al. 2004). Ces deux exemples illustrent comment différents usages de l'eau résultant d'un changement de mode de vie peuvent présenter l'opportunité pour un pathogène de devenir émergent (Pedley et al., 2004).

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. Le complexe *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi* et *M. chelonae* sont responsables de la majorité des infections dans les pays développés (Horsburgh 1996) alors que *M. ulcerans* est responsable de maladies ulcérales endémiques dans les pays tropicaux et subtropicaux (Pedley et al. 2004). Une étude internationale de surveillance a montré qu'entre 1976 et 1996 le nombre de souches de MNT isolées d'échantillons cliniques était en augmentation. La distribution des espèces couramment isolées est en changement constant dans la plupart des pays étudiés et de nouvelles espèces émergent (Martin-Casabona et al. 2004). Actuellement *M. avium-intracellulare* devient responsable de plus de 80% des mycobactérioses du SIDA alors que *M. kansasii* et *M. xenopi* infectent primordialement les sujets exempts de SIDA (Ziza et Desplaces 2006). La MNT la plus pathogène est *M. kansasii* capable de provoquer une maladie chez les individus en bonne santé quand l'inoculum est élevé. Les autres MNT deviendront pathogènes dans trois circonstances : introduction accidentelle ou nosocomiale, lésions préexistantes pulmonaires, immunodépression (Ziza et Desplaces 2006).

Les manifestations cliniques les plus courantes sont les infections pulmonaires, des ganglions lymphatiques, de la peau et des tissus mous, ainsi que les infections disséminées (Vaerewijck et al. 2005). Les voies supérieures, le tractus digestif et la peau sont les tissus les plus souvent colonisés. Les infections sont des affections chroniques caractérisées par l'établissement de granulomes tissulaires. L'infection est due à la persistance du pathogène qui n'est pas éliminé par les défenses de l'hôte, à la virulence de la bactérie et à la taille de

l'inoculum (Ziza et Desplaces 2006). Il est possible que la susceptibilité individuelle à l'infection puisse avoir une composante génétique.

Les infections des tissus mous incluent les abcès post-traumatiques, l'ulcère de Buruli (causé par *M. ulcerans* or *M. shinshuense*) et les infections cutanées à *M. marinum* qui affectent les aquariophiles, les professions en contact avec les poissons et le public des piscines (Aubry et al. 2002). L'infection des ganglions lymphatiques peut être causée par différentes espèces dont le complexe *M. avium* et atteint souvent les enfants de moins de 5 ans. L'incidence de cette infection a particulièrement augmentée dans les pays qui ont arrêté la vaccination obligatoire par le BCG (ex. Suède). En France la décision d'arrêter cette vaccination, prise en juillet 2007, fait craindre une augmentation de ces infections dans les années à venir et nécessite de mieux développer la prévention contre les MNT. Les infections pulmonaires causées par le complexe *M. avium* sont vues le plus souvent chez les personnes avec une pathologie broncho-pulmonaire, les personnes atteintes du SIDA ou de cancers. Enfin, les infections généralisées surviennent chez les malades immunodéprimés, non seulement par une maladie d'immunodéficience comme les patients atteints du SIDA (l'incidence dans le SIDA a plutôt diminué dans les pays développés avec l'introduction de la thérapie antiretrovirus), mais aussi chez les malades qui doivent recevoir un traitement immunosuppresseur en cas de greffes, cancers et autres pathologies chroniques.

Le traitement des mycobactérioses est souvent long et difficile, car ces bactéries sont naturellement résistantes à la plupart des antibiotiques et développent des résistances aux rares antibiotiques auxquelles elles sont sensibles. On a le plus souvent tendance à utiliser les macrolides et les quinolones qui sont généralement actives contre les mycobactéries (Cambau et Jarlier 1996, Ziza et al. 2006).

2.3. Sources et réservoirs

Les MNT peuvent infecter les humains et les animaux par différentes voies d'exposition qui incluent l'ingestion, l'inhalation et l'exposition par contact ou post-traumatique. Dans la plupart des cas l'eau a été impliquée comme route possible de transmission. En effet les MNT sont isolées de l'eau potable, des systèmes de distribution d'eau chaude, des machines à glace, des fontaines, les piscines et des aquariums (Pedley et al. 2004). Elles sont également isolées parfois en grand nombre dans les écosystèmes aquatiques comme les étangs, lacs, rivières et marais (Falkinham 2004). Les humains sont donc couramment exposés à ces bactéries par contact avec l'eau.

La Figure 4 représente les voies de transmissions à l'homme, les sources et les réservoirs potentiels. Les poissons et mollusques pas ou peu cuits et les produits laitiers sont considérés comme des voies importantes de contamination. En effet les animaux filtreurs (poissons et mollusques) concentrent les MNT présents dans les sédiments ou l'eau et les rejettent dans l'environnement ou les transmettent à leurs prédateurs (Heckert et al. 2001, Portaels et al. 2001, Marsollier et al. 2002).

L'eau traitée est également une source importante et les réseaux de distribution d'eau potable et d'eau chaude constituent des réservoirs les plus proches de l'homme dans les pays industrialisés à prédominance urbaine. En effet la résistance des MNT aux UV et aux traitements chimiques comme la chloration facilite la colonisation des réseaux de distribution d'eau potable (Stinear et al. 2004). Dans les eaux traitées, ces bactéries oligotrophes peuvent former des biofilms en absence de compétiteurs. Une étude a montré que 72% des échantillons collectés dans un système de distribution d'eau potable à Paris présentaient 1 à 500 CFU.ml⁻¹ (Le Dantec et al. 2002). Ces biofilms constituent un réservoir qui contamine l'eau du robinet destinée à la consommation et l'usage domestique. Les aérosols contaminés

créées par les douches chaudes constituent également une source importante de MNT (ex. épidémie Seine Saint Denis à *M. kansasii*, Lortholary et al. 1999). Selon la législation européenne (98/83/CE) l'eau destinée à la consommation humaine ne devrait contenir aucun pathogène à des densités pouvant affecter la santé humaine. Cependant ces normes ne prennent pas en compte les pathogènes émergents tels que les MNT.

Les MNT colonisant les réseaux de distribution, proviennent des eaux de surface et souterraines utilisées pour le captage par les usines de traitement. Parce que ces eaux sont les milieux de vie naturels des MNT, les sédiments des rivières et l'interface air/eau peuvent constituer des réservoirs. Ces milieux aquatiques reçoivent diverses pollutions diffuses et ponctuelles, incluant les rejets des systèmes séparatifs et de systèmes unitaires des eaux de pluie et des eaux usées (CIWEM/IWA 2000, Ellis 1991). Ainsi les rejets de temps de pluie constituent une source majeure de MNT dans les eaux urbaines utilisées pour la production d'eau potable ou pour les activités de récréation. Pickup et al. (2005) ont rapporté que la présence de MNT dans les rivières est fortement influencée par les rejets de temps de pluie et corrélée avec l'augmentation des indicateurs fécaux. De plus les pluies drainent le bassin versant, lessivant des sols naturellement colonisés par les MNT ou contaminés par l'épandage de lisier ou de boues activées. L'homme peut alors se contaminer par contact avec une eau contaminée ou par inhalation d'aérosols que ce soit dans les activités de récréation ou dans des activités de lavage.

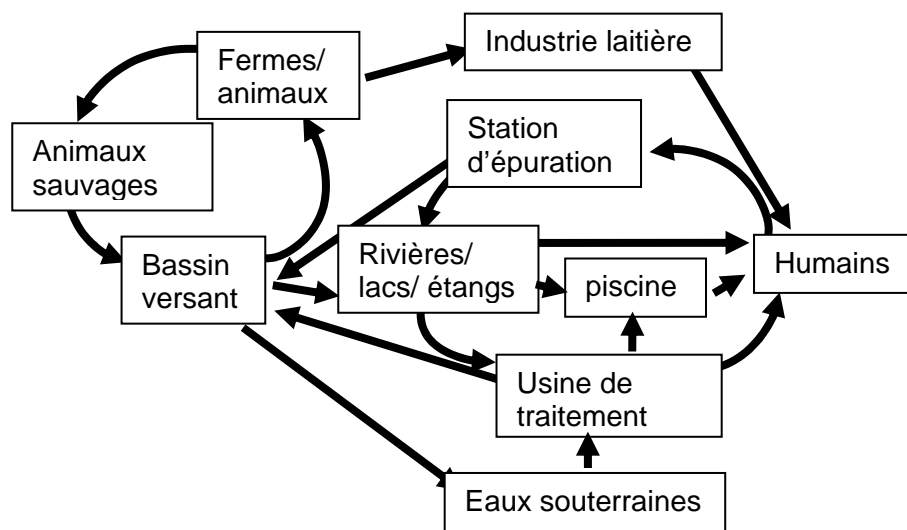


Figure 4. Sources et réservoirs environnementaux de MNT et voies d'expositions de l'homme (inspiré de Pickup et al. 2006)

Les animaux sauvages contribuent aussi à la persistance de MNT dans l'environnement et aux cycles de réinfection (Pickup et al. 2005). Les mammifères, oiseaux, poissons, invertébrés et protozoaires peuvent servir d'hôtes et de vecteurs (Vaerewijck et al. 2005). Certaines MNT ont été montrées comme vivant à l'intérieur d'amibes et de ciliés. Cette association avec les protozoaires peut constituer une stratégie de survie pour les MNT et peut augmenter leur virulence (Cirillo et al. 1997). *M. marinum* est un pathogène avéré des poissons qui peut aussi infecter les humains par la peau abrasée (Aubry et al. 2002, Ucko and Colorni 2005). Les espèces du complexe *M. avium* peuvent infecter divers mammifères et

oiseaux et constituent une cause significative de maladies chez l'homme (Falkinham et al 2004). Bien que soupçonnée d'exister, la transmission de l'animal vers l'homme n'est pas avérée.

Cette Figure 4 est un modèle théorique, cependant on connaît très mal les réservoirs et sources de MNT dans l'environnement. Une connaissance accrue de la diversité et de la quantité des MNT dans divers réservoirs environnementaux devrait aider à lier les cas cliniques et leurs sources (Falkinham et al. 2004). Actuellement il existe peu d'études quantitative sur la présence des différentes espèces de MNT dans les environnement aquatiques. Ceci est notamment lié au manque de techniques de quantifications adaptées à l'environnement

3. Méthodes de recherche de mycobactérie dans les eaux

Il existe de nombreuses méthodes décrites pour détecter les MNT dans les échantillons cliniques, la plupart ne sont pas adaptées pour les échantillons de l'environnement. De plus une grande majorité n'est pas quantitative car le milieu médical base son diagnostic sur la présence du pathogène sans souci de le dénombrer. La recherche épidémiologique des sources et réservoirs dans l'environnement (sol, aérosols et eau) nécessite donc le développement de méthodes quantitatives. La quantification des microorganismes peut soit se faire de manière indirect en cultivant les organismes sur milieu liquide ou solide, soit de manière directe en comptant les cellules ou en quantifiant un biomarqueur (ADN ou lipides) sans passer par une étape de culture (Atlas et Bartha 1997). Malheureusement il n'y a aucun protocole standard et la plupart des techniques sous-estiment le nombre de MNT dans les échantillons. Traditionnellement les mycobactéries sont quantifiées en milieu de culture solide. Cependant les cultures prennent du temps (quelques semaines à 2 mois d'incubation) et sont trop sélectives (-1 à 10% comparé aux comptages directes). L'utilisation récente de techniques directes chimiques ou moléculaires améliore la vitesse et la précision des diagnostics (Stinear et al. 2004). Récemment ont vu se développer la PCR en temps réel, les techniques d'hybridation et les nanocapteurs.

3.1. Méthodes indirectes

La culture des microorganismes peut se faire en milieu liquide ou solide. La plupart des techniques décrites utilisent les milieux solides. Si la concentration en MNT dans l'échantillon est supposée faible (ex. eau traitée) l'échantillon devra être concentré. Ensuite une technique de décontamination doit être utilisée pour se débarrasser des microorganismes compétiteurs qui croissent plus rapidement que les mycobactéries (Stinear et al. 2004). En effet il n'existe pas de milieu sélectif pour les mycobactéries.

L'étape de concentration peut se faire par filtration (porosité 0.45 μm) ou par centrifugation de l'échantillon de volumes variants entre 25 et 1000 ml. Elle se fait soit en amont, soit en aval de la décontamination. La décontamination est réalisée par l'emploi d'acides, de bases ou de détergents. Cette technique se base sur la résistance relative des mycobactéries aux traitements chimiques du fait de leur paroi riche en lipides et acides mycoliques. Différentes combinaisons de méthodes de concentration et de décontaminations avec différents milieux de culture ont été proposées sans arriver à un consensus sur la meilleure méthode (Tableau 2). Cependant il semble que le traitement au détergent chlorure de cetylpyrididium (CPC) stimule la croissance de nombreuses MNT avec des contaminations faibles en bactéries interférentes (Stinear et al. 2004). L'efficacité des décontaminants dépend de leur concentration et du temps de contact et dépend des espèces de MNT (Hunter et al.

2001). Un enrichissement de l'échantillon en MNT a été testé en utilisant des billes paramagnétiques (IMS) couvertes d'anticorps anti-mycobactéries (Li et al. 1996). Il existe aussi une méthode utilisant un milieu liquide 7H9 modifié (MGIT, BBL Microbiology systems) qui contient une molécule fluorescente sensible à l'oxygène, ce qui permet une culture en automate.

Ces méthodes de cultures ont des avantages et des inconvénients. Les étapes de concentration et de décontamination entraînent souvent la perte de mycobactéries cultivables, et les milieux de culture sont toujours relativement sélectifs car ils ne mettent pas en évidence certains organismes non cultivables (Atlas et Bartha 1997). Ainsi Pickup et al. (2005) ont noté que plusieurs espèces de MNT dans la rivière Tall (GB) ne peuvent pas être récupérées par culture. De fait la plupart des études de surveillance donne des données biaisées quant au nombre de MNT présentes dans l'eau. De plus les méthodes de cultures ne permettent pas de dénombrer les organismes viables mais non cultivables. Autre inconvénient majeur, les mycobactéries sont généralement des bactéries à croissance lente dont la culture peut prendre 1 semaine à plusieurs mois. Néanmoins, les cultures restent nécessaires pour décrire les espèces et pour mieux comprendre leur physiologie et leur génétique, ainsi que pour tester leur sensibilité aux antibiotiques.

Tableau 2. Méthodes utilisées pour isoler les mycobactéries de l'environnement (adapté de Stinear et al. 2004)

Concentration	Décontamination	Milieu de culture	Référence
Centrifugation	CPC 0.005% 30 min	7H10 à 37°C	Falkinham et al. 2001
Filtration	SDS/NaOH	Lowenstein-Jensen à 37°C	Le Dantec et al. 2002
Filtration	CPC 0.005% 15 min	BACTEC et Lowenstein-Jensen, à 37°C	Peters et al. 1995
centrifugation	aucune	Tsukamura minimal+Tween 80+cycloheximide, à 37°C	Von Reyn et al. 1993
centrifugation	CPC 0.04% 30 min	7H10+cycloheximide à 37°C, 10% CO ₂	Covert et al. 1999
centrifugation	CPC 0.04% 30 min	7H10+cycloheximide à 30°C, 5% CO ₂	Leoni et al. 1999
Filtration	NaOH+cycloheximide+vert de malachite	Milieu œuf à 30°C	Neumann et al. 1997
Filtration	CPC 0.05% 30 min	Lowenstein-Jensen à 30°C	Neumann et al. 1997
Centrifugation	3% SDS+4%NaOH, 2% cetrimide	Lowenstein-Jensen à 30 et 37°C	Parashar et al.2004
Filtration + billes de verre	1M NaOH, 5% acide oxalique	Milieu oeuf + glycerol+ pyruvate + cycloheximide pH 5.5 à 30°C	Ilvanainen et al. 1993
Filtration + billes de verre	2 M H ₂ SO ₄ + cycloheximide	Milieu oeuf + glycerol+ pyruvate + cycloheximide pH 5.5 à 30°C	Ilvanainen et al. 1993
Centrifugation, IMS,	CPC 0.005% 30 min	Brown & Buckle à 30°C	Stinear et al. 2000

3.2. Méthodes directes

Les méthodes directes de quantification s'affranchissent de l'étape de culture. On peut soit compter les cellules au microscope à épifluorescence ou au cytomètre de flux après hybridation des sondes nucléiques ou immunomarquage, soit quantifier l'ADN en PCR temps réel ou sur micropuces à ADN. Ces méthodes offrent l'avantage de prendre en compte les bactéries viables non-cultivables (Stinear et al. 2004). Néanmoins elles peuvent surestimer les quantités de MNT car elles ne permettent pas de distinguer les cellules mortes des vivantes. Cependant les méthodes sont limitées par la difficulté à lyser ou perméabiliser les parois cellulaires des mycobactéries et par la spécificité des anticorps ou des sondes et des amorces nucléiques.

Hybridation et immunomarquage

Le marquage spécifique des cellules par une sonde nucléique ou des anticorps couplés à un marqueur fluorescent permet de visualiser sélectivement les MNT. L'hybridation in situ de sondes nucléiques spécifiques du genre *Mycobacterium* nécessite la pénétration de la cellule. L'efficacité de la technique dépendra donc de la perméabilisation de la paroi mycobactérienne qui est particulièrement hydrophobe et résistante. La perméabilisation de la membrane par hydrolyse à l'HCl et déshydratation à l'alcool est moyennement efficace comparée à l'action combinée de lysozyme et de triton X-100 (Cimino et al. 2006). Les sondes utilisées pour l'hybridation in situ sont constituées d'oligonucléotides dont l'ossature sucre-phosphate est remplacée par des unités répétées de N-(2-aminoethyl) glycine (PNA ou peptide nucleic acids). Plus hydrophobes ces sondes pénètrent plus facilement la paroi des mycobactéries (Lehtola et al. 2006). Après hybridation les cellules de MNT sont comptées à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou d'un cytomètre de flux (Hongmanee et al. 2001). Une alternative à l'hybridation in situ de sondes nucléique est le marquage fluorescent des cellules par des anticorps anti-mycobactéries (Chang et al. 2005), les cellules sont ensuite comptées au microscope ou en cytométrie de flux.

L'utilisation de sondes nucléiques spécifiques peut aussi se faire sur de l'ADN ou ARN extraits de l'échantillon par lyse cellulaire. La aussi la quantification dépendra de l'efficacité de l'étape de lyse, soit par des techniques physiques (sonication, chocs thermiques), chimiques (NaCl, détergents) ou enzymatiques (lysozyme, protéinase ou achromopeptidase). L'hybridation d'extraits nucléiques avec des sondes spécifiques peut se faire en microplaques (Nieman et al 2006) ou sur des puces à ADN (Tobler et al. 2006, Fukushima et al. 2003).

PCR en temps réel

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique qui sert à amplifier l'ADN ou l'ARN au cours de plusieurs cycles de températures de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. Cette réaction est catalysée par la Taq polymérase (enzyme supportant des températures élevées). Cette enzyme copie les simples brins d'ADN en brins complémentaires en débutant la polymérisation des nucléotides à partir d'une amorce. Pour amplifier un fragment de gène d'une taille définie, on utilise une amorce sens et une amorce anti-sens qui se fixent chacune sur un des brins complémentaires.

La technique de PCR en temps réel consiste à mesurer à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN d'amplifiée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une estimation de la quantité initiale d'ADN. Les données de fluorescence sont transformées en logarithme afin de

linéariser la phase exponentielle d'amplification en fonction du nombre de cycles. Ce segment est modélisé par l'équation :

$$\log[\text{ADN}] = a(\text{nombre de cycle}) + b$$

La pente a est dérivée de l'efficacité de PCR, b correspond à la quantité d'ADN au cycle 0, on obtient ainsi la quantité d'ADN initiale.

Plusieurs techniques de PCR temps réel sont commercialisées : SYBR Green, molecular beacon et TaqMan. Ces techniques utilisent des sondes fluorescentes. La sonde SYBR Green s'hybride à l'ADN en double brin et émet une fluorescence lorsqu'elle est excitée. Cependant le manque de spécificité de cette sonde rend cette méthode moins intéressante que les deux autres techniques. Celles-ci utilisent une sonde spécifique qui s'hybride entre les deux amorces. La sonde porte un fluorophore à haute énergie (reporter) et un fluorophore à faible énergie (quencher) chacun à une extrémité de la sonde. Quand les deux fluorophores sont proches, aucune fluorescence n'est émise (Fluorescent Resonant Energy Transfer). La sonde TaqMan est courte, lorsqu'elle est intacte les deux fluorophores sont proches et aucune fluorescence n'est émise. Au cours de la PCR l'activité exonuclease de la Taq polymérase clive la sonde qui se trouve sur son chemin, entraînant ainsi la séparation des deux fluorophores, une lumière est alors émise (Figure 5).

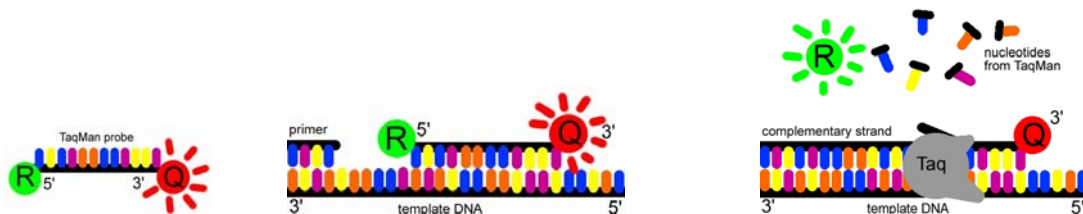


Figure 5. Principe de la sonde Taqman, R représente le reporter, Q le quencher, Taq représente l'ADN polymérase (K. Bouchard course material)

Dans le cas de la technique molecular beacon la sonde est plus longue et on utilise une polymérase sans activité exonucléase, la sonde fluorescente est seulement déplacée par la polymérase mais pas détruite. Elle se replie alors sur elle-même et n'émet plus de fluorescence car dans cette conformation les deux fluorophores sont proches.

Les tests PCR de MNT décrits dans la littérature sont basés sur l'amplification de fragments d'ADN des gènes ARNr 16S, IS6110, *hsp65*, *gyrB*, *rpoB* et la région intergénique entre les gènes de l'ARN16S et l'ARN23S (Stinear et al. 2004). Quelques protocoles de PCR en temps réel ont été développées avec les gènes ARNr 16S et *hsp65* pour quantifier spécifiquement le complexe *M. avium*, et d'autres moins spécifiques pour quantifier les MNT ou le genre *Mycobacterium* (Shrestha et al. 2003, Tobler et al 2006, Nieminen et al. 2006).

4. Action 2007

4.1. Objectifs

Toutes les méthodes ont été initialement développées pour les échantillons cliniques et sont peu adaptées pour les échantillons de l'environnement. Dans le cadre de cette année 2007, nous avons donc cherché à mettre au point deux méthodes de quantification de mycobactéries dans l'eau : l'une indirecte par culture sur milieu solide et l'autre directe par PCR en temps réel.

Pour la méthode de culture, nous avons développé un protocole de concentration par filtration, semblable à ce qui est référencé pour la recherche quantitative de légionelles. En se basant sur la littérature et l'expérience du CNRMYC, nous avons aussi comparé plusieurs méthodes de décontamination.

Pour la quantification par PCR en temps réel, nous nous sommes basés sur la publication de Tobler et al. (2006) qui utilise le gène de la protéine de choc thermique hsp65, les amorces sens et antisens et une sonde Taqman étant décrites comme spécifiques du genre *Mycobacterium*. Le gène hsp65 est une cible utile pour la détection et l'identification des mycobactéries car il présente plus de polymorphisme que le gène de l'ARNr 16S tout en ayant des zones conservées (Devallois et al. 1997). Il permet donc une détection au niveau du genre et de l'espèce. Nous avons cherché à optimiser la méthode de lyse des cellules, puis sur l'ADN extrait nous avons testé l'efficacité et la spécificité du protocole de Tobler et al. (2006).

4.2. Matériel et méthodes

Souches bactériennes

Les tests de la méthode de quantification par culture sur milieu solide et de la méthode de quantification par PCR en temps réel ont été réalisés sur des souches bactériennes du CNRMYC et du Crecep. Pour la culture, les souches suivantes ont été utilisées : *Mycobacterium chelonae*, *M. gordonae*, *M. avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp.. Pour la PCR ont été ajoutées les souches suivantes : *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Aeromonas media*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* et *Microcystis* sp.

Les densités sont rapportées en Unité Formant Colonie (UFC) par litre. Pour chacune des souches de mycobactéries, des échantillons d'eau distillée stérile ont été contaminés avec 102 à 108 UFC.l-1 de la souche. Pour tester l'efficacité de la méthode de décontamination, des suspensions de mycobactéries étaient contaminées avec 104 UFC.l-1 de *P. aeruginosa* et *Bacillus* sp..

Dénombrement en milieu solide

Les dénombrements ont été réalisés en concentrant 300 ml d'eau contaminée par filtration sur membrane de polycarbonate (0.45 µm de porosité, 45 mm de diamètre). La membrane était soniquée 10 min dans un bain à ultrasons en présence de 5 ml d'eau distillée stérile. Afin d'améliorer le détachement des mycobactéries de la membrane, le flaconnage (verre ou plastique), le temps de sonication (0 à 15 min) et l'ajout de détergents (SDS 0.2%, SDS 0.4%, Tween 80 à 1%) ont été testés en duplicata pour différentes densités de *M. chelonae*, MNT à croissance rapide et peu exigeante.

Ensuite, pour décontaminer les échantillons d'eau, plusieurs méthodes ont été testées sur différentes densités de *M. chelonae* : CPC 0.05% pendant 30 min, traitement à l'H₂SO₄ pendant 15 min suivi ou non d'une neutralisation à la soude (4%, 15% ou 30%), et traitement au SDS 3% + NaOH 1% pendant 30 min suivi d'une neutralisation avec H₂SO₄.

Les tests ont été réalisés sur des suspensions avec différentes concentrations de *M. Chelonae*. Pour chaque suspension traitée, cinq aliquots de 0.2 ml étaientensemencés sur milieu agar tryptone soja et incubé à 30°C.

Les deux meilleures méthodes ont ensuite été comparées sur *M. gordonae* et *M. avium* pour évaluer leur efficacité en fonction de l'espèce. Pour chaque échantillon testé, cinq aliquots de 0.2 ml étaientensemencés sur milieu agar 7H10 et incubé à 30°C

PCR en temps réel

Les extractions d'ADN ont été réalisées en utilisant les kits Qiagen Genomic DNA Extraction kit. Ces extractions ont été réalisées sur *M. chelonae*, *M. gordonae* et *M. avium*. Sur des colonies isolées, plusieurs protocoles ont été testés, mettant en œuvre différents temps de lyse par le lysozyme et la protéinase K, afin de trouver le plus performant pour l'extraction d'ADN de mycobactéries. Des protocoles ont également testés sur des échantillons d'eau distillée artificiellement contaminés par différentes concentrations des trois espèces. Après filtration de 100 ml d'eau sur membrane en polycarbonate (0.45 µm) les membranes ont été digérées par pendant 1h à 37°C et purifiée sur kit Qiagen Genomic DNA Extraction.

A partir de l'ADN extrait nous avons réalisé des PCR en temps réel sur un ABI 7500 (Applied Biosystems).en utilisant le protocole et les amorces et sonde de Tobler et al. (2006)

- amorce sens : 5'-TAGGTCGGGACGGTGAG-3'
- amorce antisens : 5'-TGCGAAGTGATTCCTCC-3'
- sonde 5'FAM-CGTCCGTCGCGGGCRCTGMRC-BHQ-3'

Le gène ciblé par ces amorces est le gène codant la protéine de choc thermique hsp 65. La spécificité des amorces et de la sonde a été testé sur *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Aeromonas media*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* et *Microcystis* sp.

4.3. Résultats et discussion

Dénombrement en milieu solide

Notre premier résultat est la constatation que l'étape de filtration entraînait une perte considérable (de 95.1±5.6%) du nombre d'UFC de mycobactéries. Ceci a remis en cause les résultats quantitatifs présentés dans la littérature qui probablement ont sous-estimé la présence de mycobactéries dans l'eau. Ceci a aussi renforcé notre objectif de développer en parallèle de la culture une méthode directe basée sur l'ADN.

Cette perte n'est pas due à la porosité des filtres (pas de cellules dans les filtrats) mais aux caractéristiques de la paroi des mycobactéries qui leur confère leur capacité à s'attacher aux surfaces hydrophobes (Alavi et al. 2007). En effet une mise en culture solide et liquide des filtres soniqués 10 min a montré que *M. chelonae* reste attachée au filtre même après la sonication. Le temps de sonication des membranes a eu un effet significatif sur le nombre de colonies de *M. chelonae* cultivant ensuite sur milieu trypticase-soja (ANOVA, $F_{3,5} = 9,15$; $p = 0.029$). Le test de Tukey montre qu'après 5 et 10 min le nombre d'UFC est significativement plus élevé qu'après 15 min. Il n'y a pas de différence significative entre 0, 5 et 10 min, mais à 10 min les densités sont plus élevées et les dénombrements sont moins variables (Figure 6).

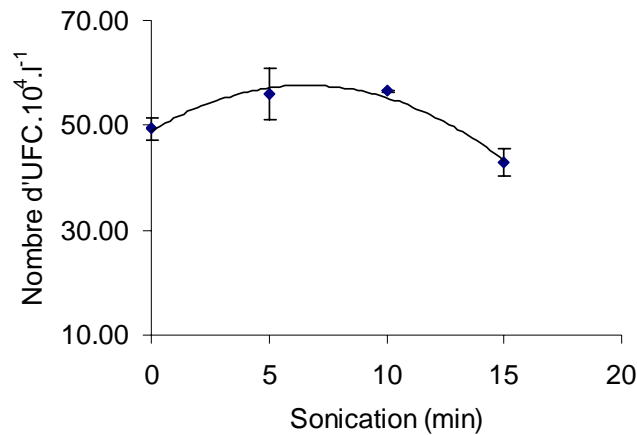


Figure 6. Effet du temps de sonication des membranes sur le nombre d'UFC de *M. chelonae* cultivant sur milieu Trypticase-soja

Nous avons tenté d'optimiser la récupération des cellules à partir des membranes en testant le choix du flaconnage pour effectuer la sonication et l'ajout d'un traitement par un détergent. On constate une interaction entre le traitement et le flaconnage (Figure 7). En flacon de verre il n'y pas de différence significative entre les traitement même si les traitements SDS 0.2% et 0.4% semblent plus efficaces que le tween (Anova, $F_{2,5}=3.98$, $p=0.143$). En flacon plastique c'est le Tween 80 à 1% qui permet de détacher significativement plus de bactéries de la membrane (Anova et test de Tukey, $F_{2,5}=33.68$, $p=0.009$). L'utilisation de détergent améliore donc sensiblement la récupération des cellules, mais ne permet toutefois pas une récupération complète. Certains auteurs s'affranchissent de ce problème en posant le filtre directement sur le milieu de culture (Hilborn et al. 2006). Dans notre expérience, la culture du filtre ne permet un dénombrement que dans le cas où les quantités de mycobactéries sont faibles, soit < 100 L. La centrifugation de l'échantillon (Parashar et al. 2004) pourrait être testée mais on sait que les mycobactéries, du fait des propriétés de leur paroi décrites ci-dessus, adhèrent aux parois des tubes de centrifugation.

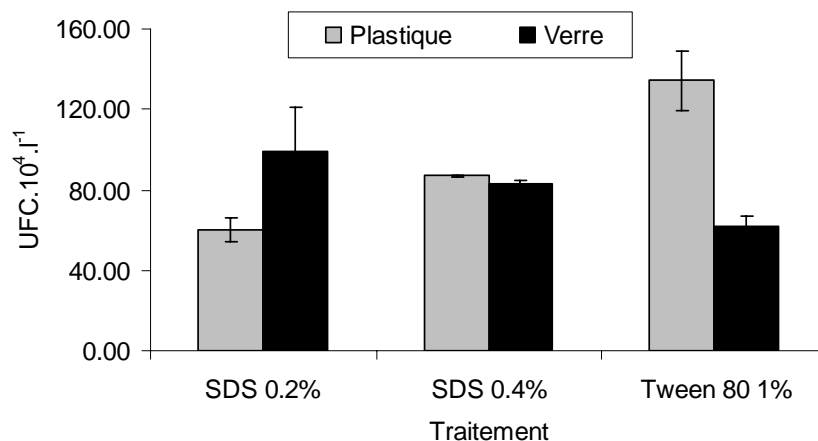


Figure 7. Comparaison entre les différents traitements pour détacher les cellules des filtres

Concernant la décontamination, les comparaisons des méthodes que nous avons sélectionnées montrent que la flore interférente est totalement inhibée par les différents traitements (

Tableau 3). Par contre les décontaminants ont aussi un effet négatif sur la croissance des mycobactéries. Le traitement au CPC 0.05% occasionne 75% de perte de colonies alors que l'acide entraîne une perte de 97% des colonies (Tableau 3). Les traitements au NaOH sont les plus agressifs pour les mycobactéries avec des pertes de 99,8 à 100% (Tableau 3).

Tableau 3. Comparaison du pourcentage de perte des UFC de *M. chelonae* en fonction du traitement de décontamination après sonication de 10 min

Décontamination	% de perte		
	<i>M. chelonae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Bacillus</i> sp.
CPC 0.05% - 30min	74.8±14.2	100.0±0.0	100.0±0.0
H ₂ SO ₄ 4% - 15 min	97.5±2.3	100.0±0.0	100.0±0.0
H ₂ SO ₄ 4% - 15 min + NaOH 4%	99.9±0.1	Nd	Nd
H ₂ SO ₄ 4% - 15 min + NaOH 15%	99.5±1.6	100.0±0.0	100.0±0.0
H ₂ SO ₄ 4% - 15 min + NaOH 30%	99.9±0.1	100.0±0.0	Nd
SDS 3% + NaOH 1% + H ₂ SO ₄	100.0±0.0	Nd	Nd

En effet ces traitements peuvent convertir une portion de cellules dans un état viable mais non-cultivable (Stinear et al. 2007). Nos résultats sont un peu contradictoires avec la littérature. En effet Kamala et al. (1994) ont trouvé que le traitement avec 3% de SDS combiné à 1% de NaOH est le plus effectif pour isoler des mycobactéries des échantillons d'eau. Cependant le but de ces auteurs n'est pas forcément de quantifier mais seulement de se débarrasser de la flore interférente pour isoler des MNT sans se soucier du % de récupération. De plus Parashar et al. (2004) ont aussi remarqué la variation de l'efficacité des méthodes de décontamination en fonction de la provenance des échantillons. En effet il est connu que les espèces mycobactériennes n'ont pas la même résistance aux différentes procédures de décontamination (Parashar et al. 2004).

Ceci est confirmé par nos résultats sur *M. chelonae*, *M. gordonae* et *M. avium* après filtration sur membrane en polycarbonate, 10 min d'ultrasons en présence de SDS 0.4%, et traitement au CPC 0.05% ou à l'acide sulfurique 4% (Figure 8). Les deux méthodes n'occasionnent pas la même perte de MNT selon les espèces (Figure 8). Même si le traitement à l'acide est répétable pour *M. gordonae* (manova, variance inter-échantillons significative, F1,4=25.34, p=0.001 ; variance intra-échantillon F1,4=1.45, p=0.074), la méthode n'est pas encore satisfaisante car elle varie trop d'une espèce à l'autre et entraîne trop de perte de cellules. Ces résultats montrent la difficulté à établir un protocole répétable de quantification par culture sur milieu solide.

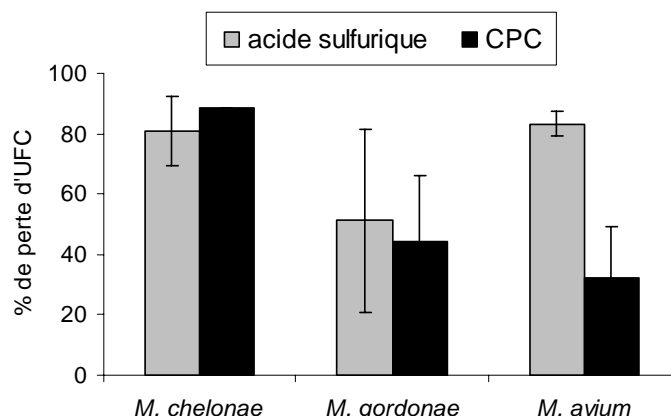


Figure 8. Pourcentage de perte d'UFC occasionné par les traitements à l'acide sulfurique et au CPC sur différentes espèces de MNT

PCR en temps réel

Malgré l'utilisation de lysozyme et de protéinase K, peu d'ADN a pu être récupéré des colonies et le temps d'incubation a eu un effet peu significatif sur la lyse. De plus plusieurs échantillons étaient dégradés. Tell et al. (2006) en comparant plusieurs méthodes d'extraction d'ADN de mycobactéries ont trouvé que l'action des billes de verre combiné à la lyse enzymatique donnait de meilleurs résultats que la lyse enzymatique seule ou combinée à des chocs thermiques.

Nous avons cependant pu amplifier avec succès le gène *hsp65*. Les trois espèces de mycobactéries testées répondaient bien au couple sonde/amorces. Les efficacités de PCR étaient comprises entre 90 et 100% pour les trois espèces de MNT (Figure 9). La limite de quantification de cette méthode était de 10 copies d'ADN. Cependant due à la faible efficacité de la méthode d'extraction, seuls 0.3 à 5% des mycobactéries ensemencées étaient détectées.

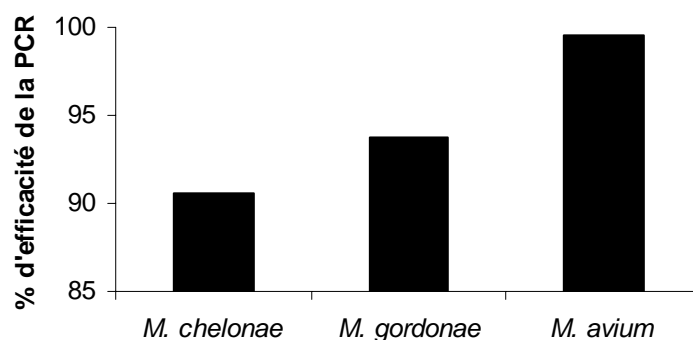


Figure 9. Efficacité de la PCR en temps réel en fonction des espèces MNT

La spécificité de la méthode a également été testée. Selon Tobler et al (2006), ce couple amorces/sondes permet l'amplification chez au moins 34 espèces différentes de mycobactéries excepté *M. celatum*, *M. heckeshornense* et *M. leprae*. Par contre ils n'indiquent

pas si leurs amorces amplifient des bactéries autres que les mycobactéries. Les ADN de différentes espèces bactériennes, possiblement rencontrées dans les eaux, ont été extraits et testés : *Aeromonas media*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* et *Microcystis* sp.. Cette PCR a révélé une amplification de l'ADN de *Aeromonas media* et *Helicobacter pylori* : les amorces ne sont donc pas complètement spécifiques du genre *Mycobacterium*.

Afin d'améliorer la spécificité des amorces, la stringence des conditions PCR a été augmentée en élevant la température d'hybridation, sans succès. Une amplification aspécifique est toujours visible sur les ADN d'*Aeromonas media* et *Helicobacter pylori* (Figure 10). Ces amorces ne sont donc pas adéquates pour la détection de MNT dans les environnements aquatiques ou de nombreuses espèces de différents groupes bactériens coexistent (Atlas et Bartha 1997).

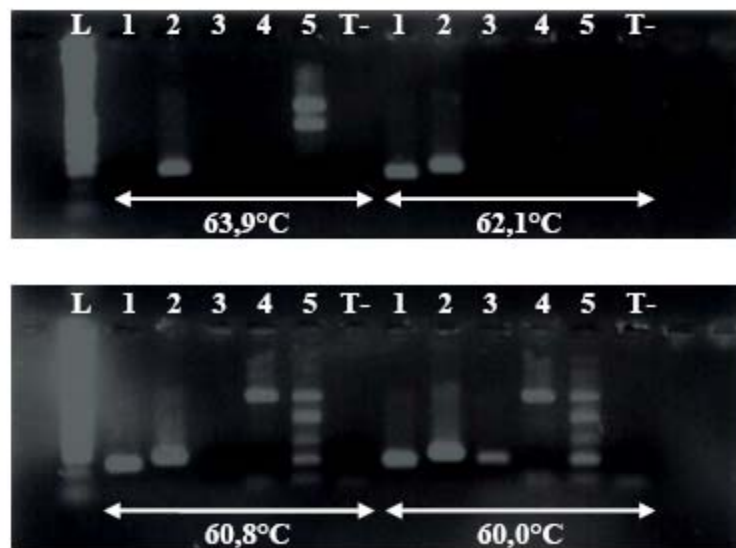


Figure 10. Amplification du gène *hsp65* à différentes température d'hybridation. L: marqueur de taille, 1: *M. chelonae*, 2: *M. gordonae*, 3: *M. avium*, 4: *A. media*, 5 : *C. pylori* et T : témoin négatif

5. Conclusion

L'importance grandissante des infections aux MNT pose de nouveaux défis quant à leur détection dans les environnements aquatiques afin d'établir les sources et les réservoirs environnementaux. Ce besoin devient notable alors que changent nos usages de l'eau et notre vulnérabilité à ces pathogènes résistants aux traitements de décontamination et à de nombreux antibiotiques. La possibilité de contrôler ces pathogènes aux travers de normes, de stratégies de gestion de la qualité de l'eau et d'information sur les risques liés à certains usages de l'eau devient donc évidente. Malheureusement notre connaissance des mycobactéries non-tuberculeuses est encore limitée par le manque de méthodes de quantification fiable. Nous avons ainsi montré que des méthodes décrites ne sont pas forcément satisfaisantes et que nous devons poursuivre notre étude en 2008.

6. Perspectives

Pour l'année 2008, nous allons améliorer et finaliser la méthode de comptage sur milieu solide, en affinant la décontamination et en testant d'autres méthodes de concentration des échantillons (filtration sur des membranes de nature différente et centrifugation). Pour la PCR en temps réel, nous allons optimiser le rendement d'extraction d'ADN en comparant des méthodes de lyse cellulaires (chocs froids-chaud, détergents, enzymes lytiques) combinées au kit d'extraction d'ADN du sol. Un travail d'inventaire des amorces spécifiques des mycobactéries dans la littérature est en cours. Les couples d'amorces les plus prometteurs seront retenus et adaptés à une méthode de PCR en temps réel pour le genre *Mycobacterium* et pour quelques espèces ciblées.

Enfin en 2008, deux campagnes d'échantillonnage en temps de pluie se feront en collaboration avec les actions « bactéries fécales » et « interaction matière organique-métaux ». L'échantillonnage se fera dans l'axe de la Seine, entre Clichy et l'amont d'Achères à la sortie d'un système unitaire (collaboration avec le SIAAP) et à la sortie d'un système pluvial séparatif, le site restant encore à déterminer. Les échantillons seront conservés pour quantifier les MNT par PCR en temps réel. Une partie des échantillons sera égalementensemencée sur milieu solide afin de confirmer les résultats de la PCR en temps réel, d'isoler des MTN et d'évaluer le degré et la nature de la contamination par les bactéries autres que les mycobactéries.

7. Bibliographie

- Ahmad S., Akbar P. K., Wiker H. G., Harboe M. et Mustafa A. S. (1999). Cloning, expression and immunological reactivity of two mammalian cell entry proteins encoded by the *mce1* operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* **50**: 510-518
- Alavi MR., Shukla HD., Whitaker B. Arnold J., Shahamat M. (2007). Attachment and biofilm formation of *Mycobacterium marinum* on a hydrophobic surface at the air interface. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 93-101
- Atlas, R.M. and Bartha, R. (1997). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Benjamin.Cummings Science, New York.
- Aubry A., Pan X.S, Fisher L.M., Jarlier V., et Cambau E. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1281-1288
- Bland CS., Ireland JM., Lozano E., Alvarez ME., et Primm TP. (2005). Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 5719-5727.
- Cambau E, et Jarlier V. (1996). Resistance to quinolones in mycobacteria. *Res. Microbiol.* **147**:52-59.
- Chang SC., Anderson TL., Bahrman SE., Gruden CL., Khijniak AI., et Adriaens P. (2005). Comparing recovering efficiency of immunomagnetic separation and centrifugation of mycobacteria in metalworking fluids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 629-638
- Cimino M., Alamo L. et Salazar L. (2006). Permeabilization of the mycobacterial envelope for protein cytolocalization studies by immunofluorescence microscopy. *BMC Microbiology* **6**:35-37
- Cirillo JD., Falkow S., Tompkins LS., et Bermudez LE. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* **65**:3759-3767
- CIWEM / IWA (2000). *Diffuse pollution impacts : The environmental and economic impacts of diffuse pollution in the UK*. In: D'Arcy BJ, Ellis JB., Ferrier RC., Jenkins A., Dils R. (Eds). UK Chartered Institution of Water and Environmental Management and the Int. Water Association, Terence Dalton Ltd. Suffolk, UK.

- Covert TC., Rodgers MR., Reyes AL., et Stelma GN. (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2492-2496
- Daillox M., Laurain C., Weber M. et Hartemann P.H. (1999). Water and nontuberculous mycobacteria. *Wat. Res.* **33**:2219-2228.
- Devallois A., Goh KS., Rastogi N., (1997). Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2969-2973
- Ellis JB. (1991). Urban runoff quality in the UK : problems, prospects and procedures. *Appl. Geog.* **11** : 187-200.
- Falkinham JO (2004). *Environmental sources of Mycobacterium avium linked to routes of exposure.* In : Pedley S. et al. (eds), Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, IWA Publishing, London, UK, p.26-38.
- Falkinham JO. III, Norton CD., et Le Chevalier MW. (2001). Factors influencing numbers of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1225-1231.
- Falkinham JO., Nichols G., Bartram J., Dufours A., et Portaels F. (2004). *Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance.* In : Pedley S. et al. (eds), Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, IWA Publishing, London, UK, p.15-25
- Ferdinand S., Legrand E., Seng Goh K., Berchel M., Mazzarelli G., Sola C., Tortoli E. Et Rastogi N. (2004). Taxonomic and phylogenetic status of non-tuberculous mycobacteria in a Caribbean setting. *Molecular and Cellular probes* **18**: 399-408
- Fukushima M., Kakinuma K., Hayashi H., Nagai H., Ito K., et Kuwaguchi R. (2003). Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* **41** : 2605-2615
- Griffith DE., Aksamit T., Brown-Elliott A. et al. (2007). American Thoracic Society Guidelines: Diagnosis, Treatment and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am. J. Respiratory and Critical Care Medicine* **175** : 367-417.
- Heckert RA., Elankumaran S., Milani A., et Baya A. (2001). Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 710-715
- Heifets L. (2004). Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **25** : 283-295
- Hilborn ED., Covert TC., Yakrus MA., et al. (2006). Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5864-5869
- Hongmanee P., Stender H., et Rasmussen O.F. (2001). Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous Mycobacterium species in smears of Lowenstein-Jensen and mycobacteria growth indicator tube cultures using peptide nucleic acid probes. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 1032-1035
- Horsburgh CR. Jr. (1996). Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin. Respir. Infect.* **11**: 244-251
- Ilvananien E.K., Martikainen P.J., Väänänen PK., et Katila ML. (1993). Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 398-404
- Kamala T., Paramasivan CN., Herbert D., Venkatesan P., et Prabhakar R. (1994). Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1021-1024
- Le Dantec C., Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, et Vincent V. (2002). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5318-5325
- Leoni E., Legnani P., Mucci MT. Et Pirani R. (1999). Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 683-88
- Lethola MJ., Torvinen E., Miettinen IT., et Keevil W. (2006). Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of Mycobacterium avium subsp. Avium and Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in potable-water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 848-853

- Li Z., Bai GH., von Reyn CF., Marino P., Brennan J., Gine N. Et Morris SL. (1996). Rapid detection of *Mycobacterium avium* in stool samples from AIDS patients by immunomagnetic PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1903-1907
- Lortholary O., Deniel F., Boudon P. et al. (1999). *Mycobacterium kansasii* infection in a Paris suburb: comparison of disease presentation and outcome according to human immunodeficiency virus status. *Int. j. tuberc. lung dis.* **3** : 68-73
- Lumb R, Stapledon R, Scroop A, Bond P, Cunliffe D, Goodwin A, et al. (2004). Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4906–4910.
- Mäkinen J., Sarkola A., Marjamäki M., Viljanen MK., et Soini H. (2002). Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA assays for identification of finnish mycobacterial isolates. *J. Clinical microbiology* **40** : 3478-3481
- Marsollier L., Robert R., Aubry J. Saint André JP., Kouakou H., Legras P., Manceau AL., Mahaza C., et Carbonnelle B. (2002). Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 4623-4628
- Martin-Casabona N., Bahrmand AR., Bennedsen J. et al. (2004). Non-tuberculous mycobacteria : patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **8** : 1186-1193
- Neumann M., Schulze-Robbecke R., Hagenau C., et Behringer K. (1997). Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 547-552
- Nichols G. ., Ford T., Bartram J., Dufour A., et Portaels F. (2004). Introduction. In : Pedley S. et al. (eds), *Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management.* World Health Organization, IWA Publishing, London, UK, p 2-14.
- Nieman T., Pakarinen J., Tsitko I., Salkinoja-Salonen M., Breitenstein A., Ali-Vehmas T., et Neubauer P. (2006). *J. Microbiol. Meth.* **67**: 44-55
- Niva M., Hernesmaa A., Haahtela K., Salkinoja-Salonen M., Sivonen K. et Haukka K. (2006). Actinobacterial communities of boreal forest soil and lake water are rich in mycobacteria. *Boreal Environment Research* **11**: 45-53.
- Parashar D., Chauhan DS., Sharma VD., Chauhan A., Chauhan SVS., et Katoch VM. (2004). Optimisation of procedures for isolation of mycobacteria from soil and waters samples obtained in northern India. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3751-3753
- Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo JA. 2004. *Pathogenic mycobacteria in water.* World Health Organization, IWA Publishing, 300 p
- Peters MC., Muller C., Rusch-Gerdes S., Seidel C., Gobel U., Pohle HD., et Ruf B. (1995). Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a possible source of disseminated MAC infection in AIDS patients? *J. Infect.* **31**: 39-44
- Pickup RW., Rhodes G., Arnott S., Sidi-Boomedine K., Bull TJ., Weightman A., Hurley M., et Hermon-Taylor J. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 2130-2139
- Portaels F, Fonteyne PA., et Meyers WM. (1999). Insects in transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* **353** : 986
- Shrestha NK., Tuohy MJ., Hall GS., Reischl, Gordon SM., et Procop GW. (2003). Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41** : 5121-5126
- Stinear T., Davies JK., Jenkin GA., Hayman JA., Oppedisano F. et Johnson PD. (2000). Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3206-3216
- Stinear T., Ford T. et Vincent V. (2004).. *Analytical methods for the detection of waterborne and environmental pathogenic mycobacteria.* In : Pedley S. et al. (eds), *Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management.* World Health Organization, IWA Publishing, London, UK, p 55-73.

- Tell L.A., Foley J., Needham M.L., et Walker R.L. (2003). Comparison of four rapid DNA extraction techniques for conventional polymerase chain reaction testing of three *Mycobacterium* spp. that affect birds. *Avian Diseases* **47** :1486-1490
- Tobler NE., Pfunder M., Herzog K., Frey JE., et Altwegg M. (2006) (Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-microarray, *J Microbiol Methods* **66**: 116-124.
- Torkko P., Suomalainen S., Iivanainen E., Suntavi M., Paulin L., Rudback E., Tortoli E. Vincent V., Mattila R. Et Katila ML. (2001). Characterization of *Mycobacterium bohemicum* isolated from human veterinary and environmental sources. *J. clin. Microbiol.* **39**: 207-211
- Torvinen ES., Suomalainen MJ., Lehtola IT. et al. (2004). Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1973-1981
- Ucko M., et Colorni A. (2005). *Mycobacterium marinum* infections in fish and humans in Israel. *J. clin. Microbiol.* **43** : 892-895.
- Vaerewijck MJM., Huys G., Palomino JC., Swings J., et Portaels F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems : ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol. Rev.* **29** : 911-934
- Von Reyn CF., Waddell RD., Eaton T., et al. (1993). Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire and Kenya. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3227-3230
- Wallace RJ., Jr., Cook JL. Glassroth J., Griffith DE., Olivier KN. et Gordin F. (1997). American Thoracic Society Statement: diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am. Respir. Crit. Care Med.* **156**:S1-S25
- World Health Organization (2004). *Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Third global report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002.* Document WHO/HTM/TB/2004.343. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Ziza J.M. et Desplaces N. (2006). Infections ostéoarticulaires à mycobactéries atypiques. *Revue du rhumatisme* **73** : 394-400.