



HAL
open science

Sources des mycobactéries non-tuberculeuses dans les bassins versants

Nicolas Radomski

► **To cite this version:**

Nicolas Radomski. Sources des mycobactéries non-tuberculeuses dans les bassins versants. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST1113 . pastel-00669399

HAL Id: pastel-00669399

<https://pastel.hal.science/pastel-00669399>

Submitted on 13 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-EST

École des Ponts ParisTech

École Doctorale : Sciences, Ingénierie et Environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Doctorat : Sciences et Techniques de l'Environnement

Champ disciplinaire : Microbiologie

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

**Sources of nontuberculous mycobacteria in
watersheds**

Auteur : Nicolas RADOMSKI

Directeur de thèse : Pr. Régis MOILLERON

Co-encadrante de thèse : Dr. Françoise LUCAS

Date de soutenance : 28 février 2011

Composition du jury

Benoit COURNOYER (DR CNRS)	Rapporteur	Université Claude Bernard Lyon
Pr. Christophe SOLA	Rapporteur	Université Paris Sud
Pr. Emmanuelle CAMBAU	Examineur	Université Paris Diderot
Pr. Joseph O. FALKINHAM III	Examineur	Virginia Polytechnic Institute and State University
Pr. Daniel THÉVENOT	Examineur	Université Paris-Est Créteil
Dr. Laurent MOULIN	Examineur	Eau de Paris
Dr. Vincent ROCHER	Invité	Service Public de l'Assainissement Francilien

UNIVERSITÉ PARIS-EST

École des Ponts ParisTech

École Doctorale : Sciences, Ingénierie et Environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Doctorat : Sciences et Techniques de l'Environnement

Champ disciplinaire : Microbiologie

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

**Sources of nontuberculous mycobacteria in
watersheds**

Auteur : Nicolas RADOMSKI

Directeur de thèse : Pr. Régis MOILLERON

Co-encadrante de thèse : Dr. Françoise LUCAS

Date de soutenance : 28 février 2011

Composition du jury

Benoit COURNOYER (DR CNRS)	Rapporteur	Université Claude Bernard Lyon
Pr. Christophe SOLA	Rapporteur	Université Paris Sud
Pr. Emmanuelle CAMBAU	Examineur	Université Paris Diderot
Pr. Joseph O. FALKINHAM III	Examineur	Virginia Polytechnic Institute and State University
Pr. Daniel THÉVENOT	Examineur	Université Paris-Est Créteil
Dr. Laurent MOULIN	Examineur	Eau de Paris
Dr. Vincent ROCHER	Invité	Service Public de l'Assainissement Francilien

C'est avec honneur et enthousiasme que je remercie le président du jury, **Daniel Thévenot**, les membres rapporteurs, **Christophe Sola** et **Benoit Cournoyer**, les membres examinateurs, **Emmanuelle Cambau**, **Joseph O. Falkinham III**, et **Laurent Moulin**, ainsi que **Vincent Rocher** d'avoir accepté de juger mon travail. C'est avec un immense plaisir que je vous présente ce manuscrit de thèse intégrant l'ensemble de mes travaux de recherche depuis trois ans. Je tiens à renouveler dès à présent mes remerciements qui figurent dans chacun des articles articulant ce manuscrit. Merci donc au directeur de ma thèse, **Régis Moilleron**, qui le jour de mon entretien de recrutement, m'a insufflé l'envie de publier mes travaux en me demandant de lui décrire ce qu'était la recherche à mes yeux. Réponse à laquelle j'avais oublié de souligner la nécessité de valoriser les résultats de travaux basés sur une réflexion innovante des connaissances acquises par mes pairs. Merci à ma co-encadrante de thèse, **Françoise S. Lucas**, qui m'a énormément appris sur tous les plans, en particulier sur l'analyse statistique des données, sur la construction de projet de recherche, et sur la publication de mes travaux. Merci aussi à mes autres encadrants, **Emmanuelle Cambau**, **Joseph O. Falkinham III**, **Sophie Haenn**, et **Laurent Moulin**, qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire et qui mon guidé dans mes travaux en bactériologie et biologie moléculaire.

Merci à vous tous pour m'avoir fait confiance tout au long de ma thèse. Sans oublier tous les collègues des cinq laboratoires dans lesquels j'ai construit cette thèse, je souhaite citer : **Johnny Gasperi** du Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (UMR MA102 LEESU) pour nos discussions sur les stratégies de prélèvement, **Fanny Richard** et **Héberte Accrombessi** de Eau de Paris pour nos échanges sur les méthodologies en microbiologie, **Claudine Wichlaz** de la Pitié Salpêtrière pour m'avoir fait part de vos connaissances en mycobactériologie, **Salak Gallah** et **Marie-Noël Gamard** de l'hôpital Charles Foix pour la transmission de vos compétences en bactériologie, ainsi que **Justin Tanner**, **Krista Williams**, **Myra Williams** et **Amy Pruden** du Virginia Polytechnic Institute pour votre accueil et la formidable gentillesse que vous avez pu me transmettre concernant mon intégration dans la société américaine. De plus, je souhaite saluer **Maria Laura Boschioli** de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, et **Franck Biet** et de l'Institut national de recherche agronomique pour m'avoir apporté des connaissances en mycobactériologie vétérinaire, **Frédéric Veyrier** de l'Institut Pasteur de Paris, **Marcel Behr** de l'Université de McGill et **Jacques Printems** du Laboratoire d'Analyse et de Mathématiques Appliquées (UMR 8050 LAMA) pour leur soutien en bioinformatique, **Patrick Boiron** et **Veronica Rodriguez-Nava** du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon (UMR 5557) pour m'avoir fourni des souches de *Nocardia* de référence, ainsi que **Françoise Irlinger** du Laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR 782 GMPA), sise à l'Institut Universitaire et Technologique (IUT) de Créteil, pour m'avoir fourni des Corynebacteries de référence ; IUT dans lequel j'ai réalisé auprès de **Françoise Odelin**, **Cécile Rousseau** et **Olivier Bezier**, un monitorat d'enseignement en bactériologie médicale qui m'a ouvert l'esprit sur l'enseignement en premier cycle universitaire. Merci aussi à **Catherine Lorgeoux** et **Lila Boudahmane** du LEESU pour avoir pris en charge l'analyse du carbone organique dans les sols, **Laetitia Betelli** pour l'analyse des contaminations fécales et son aide pendant les campagnes de prélèvement à la station Seine Centre, **Nicole Buet**, **Uthaya Sivanantham** et **Emile Ducarme** pour m'avoir aidé à analyser les métaux des sols, ainsi que les techniciens du Service Public de l'Assainissement Francilien (SIAAP) à Colombes pour l'analyse des paramètres physico-chimiques dans les échantillons d'eaux usées. Cette thèse suivant n'aurait aussi pas été possible sans l'aide administrative qui m'a été apportée par **Catherine Charleux**, **Annick Piazza** et **Patricia Cambergs** du LEESU, ainsi que **Catherine Alcouffe** et **Marine Daniel** des Ecoles doctorales Ville Transport Territoire et Science Ingénierie Environnement.

De son nom de jeune fille **Martine Suard** : ma mère, **Jean-Yves Radomski** : mon père, **Céline Radomski** : ma sœur, **Michaël Radomski** : mon frère, je souhaitais tout simplement vous réitérer mon affection la plus grande, et crier à qui veut l'entendre que vous êtes une famille formidable. **Glwadys le Moulmier**, toi que j'ai rencontrée en début de thèse, je souhaitais te réserver les derniers mots de cette page pour te remercier de ton soutien indéfectible durant ces trois dernières années, qui je l'espère deviendra éternité à tes côtés.

Les travaux de recherche que j'ai entrepris se sont déroulés sur huit sites dans six laboratoires en raison de la pluralité des disciplines scientifiques mises en œuvre. Plus précisément, mon laboratoire principal, le Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (LEESU), fut le laboratoire où j'ai pu mettre en place des campagnes de prélèvement sur son site de Champs-sur-Marne et où j'ai pu acquérir des données en biologie moléculaire classique et exploiter l'ensemble des données analytiques sur son site de Créteil. Dans le département de la Direction Recherche et Développement Qualité Eau (DRDQE) des laboratoires de Eau de Paris, j'ai pu utiliser le matériel de séquençage, de quantification par PCR en temps réel et spectrométrie d'émission optique, afin d'atteindre les objectifs fixés en biologie moléculaire et physico-chimie analytique. A l'hôpital Charles Foix de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), j'ai pu travailler dans le laboratoire d'analyse de routine afin de mener à bien mes travaux en bactériologie et à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière j'ai pu garder en culture des mycobactéries de référence qui m'ont été utiles pour mes travaux en biologie moléculaire. Pendant trois mois, j'ai eu aussi l'opportunité de mener des recherches bibliographiques et de conduire des travaux en biologie moléculaire dans les départements de Sciences Biologiques et d'Ingénierie Environnementales et Civiles de l'Université d'état Virginia Polytechnic Institute aux USA. Ce voyage, m'a donné en plus l'opportunité de rendre visite au laboratoire d'épidémiologie moléculaire des maladies infectieuses du centre de recherche hospitalier de l'Université de McGill au Québec, afin de conduire des travaux en bioinformatique sur la comparaison de génomes.

Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (LEESU), UMR MA-102, Université Paris Est, AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, 77455 Champs-sur-Marne, France ;
61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil, France.

Eau de Paris, Direction Recherche et Développement Qualité Eau (DRDQE), 33 avenue Jean Jaurès,
94200 Ivry sur Seine, France.

Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, Hôpital Charles Foix, 7 Avenue de la République, 94205 Ivry-sur-Seine, France ; Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Department of Biological Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 24061, USA.

Department of Civil and Environmental Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 24061, USA.

Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, McGill University Health Centre, 1650 Cedar Avenue, Montreal H3G 1A4, QC Canada.

Introduction générale	15
CHAPITRE I : Etat de l'art sur les mycobacteries dans les bassins versants	19
I / Les mycobactéries non-tuberculeuses	20
I.1 / Les généralités	20
I.1.a / La taxonomie	20
I.1.b / Les caractéristiques morphologiques	22
I.1.c / Les caractéristiques physiologiques	24
I.1.d / Les caractéristiques génétiques	25
I.2 / L'épidémiologie	28
I.2.a / Le pouvoir pathogène	28
I.2.b / L'origine environnementale	28
I.2.c / L'incidence	29
I.2.d / Les formes de mycobactériose	30
I.2.e / Les voies d'exposition	32
I.2.f / Les facteurs de virulence	34
I.2.g / Le mécanisme de virulence	35
I.3 / L'écologie	36
I.3.a / Les habitats terrestres	36
I.3.b / Les habitats aquatiques	37
I.3.c / Les interactions	41
I.3.d / Le rôle écologique	45
II / Les outils analytiques applicables aux matrices environnementales	47
II.1 / La détection et la quantification	47
II.1.a / Par microscopie	47
II.1.b / Par culture	48
II.1.c / Par chromatographie	50
II.1.d / Par outils moléculaires	50
II.2 / L'identification	54
II.2.a / La caractérisation biochimique	54
II.2.b / La caractérisation des acides mycoliques	54
II.2.c / L'hybridation inverse ou non	54
II.2.d / Le séquençage multi-locus	55
II.2.e / L'analyse phylogénique	61
II.3 / La caractérisation	61
II.3.a / A partir d'un isolement	61
II.3.b / A partir d'un échantillon complexe	63
II.4 / Conclusion et perspectives	64
III / Les sources de microorganismes pathogènes dans les bassins versants	64
III.1 / Les rejets ponctuels	65
III.1.a / Les bactéries pathogènes émergentes	65
III.1.b / Le cas des mycobactéries	66
III.2 / Les rejets diffus	66
III.2.a / Les bactéries pathogènes émergentes	67
III.2.b / Le cas des mycobactéries	67
III.3 / Les variations saisonnières	67
III.3.a / Les bactéries pathogènes émergentes	67
III.3.b / Le cas des mycobactéries	68
IV / Les objectifs de la thèse	68
IV.1 / La protection et la gestion de l'eau	68
IV.2 / La stratégie analytique	69
IV.3 / La stratégie de prélèvement	70

CHAPITRE II : Développements analytiques pour quantifier les mycobactéries dans l'environnement	75
I / Introduction	76
II / Travaux entrepris	83
II.1 / Comparaison des méthodes de culture pour l'isolement des mycobactéries non-tuberculeuses dans les eaux de surface (publié en mars 2010 dans <i>Applied and Environmental Microbiology</i>)	83
II.2 / Développement d'une méthode de PCR en temps-réel pour détecter et énumérer <i>Mycobacterium</i> spp. dans l'eau de surface (publié en septembre 2010 dans <i>Applied and Environmental Microbiology</i>)	91
II.3 / Méthode efficace d'extraction de l'ADN en vue d'une quantification par PCR en temps-réel de <i>Mycobacterium</i> spp. dans l'eau de surface (soumis en octobre 2010 à <i>Canadian Journal of Microbiology</i>)	99
III / Conclusion	104
CHAPITRE III : Sources environnementales et comportements des mycobactéries	107
I / Introduction	108
II / Travaux entrepris	109
II.1 / Le comportement de <i>Mycobacterium</i> dans une station d'épuration par temps sec : un modèle bactérien distinct de <i>Escherichia coli</i> et entérocoques intestinaux (sous presse depuis avril 2011 dans <i>Environmental Science and Technology</i>)	109
II.2 / Facteurs conditionnant les densités de mycobactéries dans les sols	114
II.3 / Impact du ruissellement en zones urbaines, péri-urbaines et rurales pendant des épisodes pluvieux sur la quantité de mycobactéries dans l'eau de surface...	119
III / Conclusion	124
CHAPITRE IV : Voies d'amélioration pour l'étude des pathogènes environnementaux ; cas des mycobactéries	127
I / Introduction	128
II / Travaux entrepris	129
II.1 / Les défis de la surveillance des pathogènes environnementaux : Etude de cas de <i>Mycobacterium avium</i> (publié en décembre 2010 dans <i>Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology</i>)	129
II.2 / Nouvelle stratégie d'identification <i>in silico</i> de séquences conservées exclusivement dans les génomes de <i>Mycobacterium</i> spp.	141
III / Conclusion	162
Conclusion générale et perspectives	165
Références	169
Annexes	191
Résumé	215
Abstract	216

Figure 1 : Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne (Legrand <i>et al.</i> 1999 ; Alsteens <i>et al.</i> 2008 ; Verbelen <i>et al.</i> 2009)	23
Figure 2 : Structures types d'acide mycolique : α -mycolate (A), α' -mycolate (B), époxy-mycolate (C), céto-mycolate (D), méthoxy-mycolate (E), γ -méthoxy-mycolate (F) et éther de mycolate (G) ; les valeurs de l, m, n et x varient de 11 à 35 atomes de carbone (Gangadharam et Jenkins 1998a)	23
Figure 3 : Synthèse du nombre de cas (A) et de forme (B) de mycobactérioses humaines recensées dans les 20 centres hospitaliers français du réseau de surveillance Azay (12 concernant <i>M. marinum</i>) entre 2006 et 2008 (données adaptée (Maugein et Bauriaud 2009))	31
Figure 4 : Proportion (%) de citations d'espèces de mycobactéries non-tuberculeuses dans la littérature rapportant leur occurrence dans différents échantillons d'eau (156 citations d'espèces dans 32 articles publiés entre 1997 et 2007).....	39
Figure 5 : Sensibilité et spécificité théoriques des couples d'amorces sens (F) et anti-sens (R) de la littérature vis-à-vis du genre <i>Mycobacterium</i> sur la base du nombre de résultats présentant un pourcentage de similitude supérieur à 90 % sur les 100 premiers résultats de BLAST réalisés sur NCBI	53
Figure 6 : Positions sur le chromosome de <i>M. avium</i> 104 (Gene Bank NC_008595) des amorces utilisées pour identifier les bactéries (rouge) et les mycobactéries (vert) par séquençage des gènes <i>rrs</i> (A), <i>gyrA</i> (B en haut), <i>gyrB</i> (B en bas), <i>hsp65</i> (C), <i>recA</i> (D), <i>rpoB</i> (E) et <i>sodA</i> (F)	57
Figure 7 : Formule de calcul de l'indice de discrimination (DI) et de la diversité allélique (h), N : nombre total de souches, S : nombre total de profils distinct, n_j : nombre de souches du $j^{\text{ème}}$ profil, n_i : nombre de souches du $i^{\text{ème}}$ allèle, x_i : fréquence des souches du $x_i^{\text{ème}}$ allèle (Nei 1978 ; Hunter et Gaston 1988)	62
Figure 8 : Schéma conceptuel des habitats (rectangles) et vecteurs (flèches) potentiels des mycobactéries non-tuberculeuses dans les bassins versants de temps sec (en haut) et de temps de pluie (en bas)	71
Figure 9 : Réalisation d'une droite d'étalonnage de PCR en temps réel par construction de l'évolution de la fluorescence en fonction des C_T d'une gamme de concentration en ADN (à gauche) et construction de la linéarisation des C_T moyens en fonction du logarithme décimal de la concentration en ADN (à droite).....	77
Figure 10 : Conditions et déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCR en temps réel basée sur l'utilisation du fluorochrome intercalant d'ADN SYBR TM Green I (Poitras et Houde 2002)	78
Figure 11 : Conditions et déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des sondes, d'hybridation des amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCR en temps réel basée sur l'utilisation d'une sonde TaqMan TM (Poitras et Houde 2002)	79
Figure 12 : Déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des sondes et amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCR en temps réel basée sur l'hybridation à deux sondes (Poitras et Houde 2002).....	80
Figure 13 : Déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des sondes et amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCRq en temps réel par balise moléculaire (Poitras et Houde 2002)	81
Figure 14 : Déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des amorces PCR (b), d'élongation (c), de dénaturation secondaire (d) et d'hybridation de la balise moléculaire (e) de la PCR en temps réel par amorce scorpion (Poitras et Houde 2002)	82
Figure 15 : Distribution des échantillons quantifiables (19 %) en fonction de leurs concentrations en mycobactéries, estimées par PCR en temps réel dans l'ensemble des prélèvements (47 positifs sur 238).....	125

Tableau 1 : Densité codante et capacité codante de génomes mycobactériens séquencés entièrement	25
Tableau 2 : Taille du génome et nombre de copies de gènes dans l'opéron <i>rrn</i> de mycobactéries non-tuberculeuses à croissances rapide (A) et lente (B)	27
Tableau 3 : Nombre de promoteurs des opérons <i>rrnA</i> et <i>rrnB</i> de mycobactéries à croissance rapide et à croissance lente possédant ou non (na : non applicable) l'opéron <i>rrnB</i>	28
Tableau 4 : Caractéristiques résistante (R), intermédiaire (I) et sensible (S) des antibiotiques classiquement utilisés pour traiter les infections <i>M. avium</i> -intracellulaire, vis-à-vis d'autres espèces de mycobactéries non-tuberculeuses (Tortoli 2006)	35
Tableau 5 : Rares cas d'étude de quantification non normalisée des mycobactéries non-tuberculeuses dans des milieux aquatiques et terrestres	36
Tableau 6 : Rares études rapportant la présence d'espèces de mycobactéries non-tuberculeuses dans différents types de sols.....	36
Tableau 7 : Etudes rapportant la présence d'espèces de mycobactéries non-tuberculeuses dans de l'eau de surface (A), de l'eau de consommation (B), des eaux usées (C), de l'eau de centre médicaux (D), de l'eau récréative (E), et d'autre type d'eau (F).....	38
Tableau 8 : Mycobactéries non-tuberculeuses isolées de sols pollués et capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	46
Tableau 9 : Amorces ciblant le genre <i>Mycobacterium</i> dans des objectifs d'identification ou de détection	51
Tableau 10 : Indice de discrimination (DI) des méthodes de caractérisation du complexe <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> (données reprises (Behr et Falkinham 2009))	62
Tableau 11 : Méthodes de caractérisation applicables à quelques espèces de mycobactéries non-tuberculeuses à l'exception du séquençage multi-locus applicable à l'ensemble des espèces (données synthétisées (Behr et Falkinham 2009))	63

Liste des abréviations

Dans le texte, le choix a été fait d'utiliser uniquement les acronymes anglais. Aussi dans cette liste, tous les acronymes sont les acronymes anglais, assortis de leur signification en français.

AFB:	acid-fast bacilli (bacilles acido-alcool-résistants)
AK:	amikacin (amikacine)
AM:	acidic mycolate (acide mycolique)
AP-PCR:	arbitrary primed PCR (typage par amorces PCR arbitraires)
ARISA:	automated ribosomal intergenic spacer analysis (analyse de l'espace intergénique ribosomal)
ATP:	adenosine-5'-triphosphate (adénosine triphosphate)
BCG:	bacilli of Calmette and Guérin (bacilles de Calmette et Guérin)
BDE 209:	decabromodiphenyl ether (éther de decabromodiphenyl)
BHQ®:	black hole quencher® (suppresseur non-fluorescent)
B-HN PCR:	balanced heminested PCR (PCR nichée et balancée)
BIBI:	bioinformatic bacteria identification (base d'identification bactérienne par bioinformatique)
BLAST:	basic local alignment search tool (algorithme de recherche d'alignement principaux fondamentaux)
BOD:	biochemical oxygen demand (demande biochimique en oxygène)
CA:	carbonate ions (ions carbonate)
CDC:	centers of disease control (centres américains de maîtrise des maladies)
CIP:	ciprofloxacin (ciprofloxacine)
CLM:	clarithromycin (clarithromycine)
CMAS:	cyclopropane mycolic acid synthase (synthase de l'acide mycolic cyclopropane)
CNM:	<i>Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium</i>
CODs:	soluble chemical oxygen demand (demande chimique en oxygène soluble)
CODt:	total chemical oxygen demand (demande chimique en oxygène total)
CPC:	cetylpyridinium chloride (chlorure de cetylpyridinium)
C _T :	cycle threshold (cycle seuil)
CTAB:	hexadecyltrimethylammonium bromide (bromure d'hexadécyltriméthylammonium)
DABCYL:	4-(4'-dimethylamino-phenylazo)-benzene (4-(4'-diméthylamino-phenylazo)-benzène)
DAPI:	4'6-diamidino-2-phenylindole (4'6-diamidino-2-phenylindole)
DGGE:	denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse de gel en gradient dénaturant)
dHPLC:	denaturing high performance liquid chromatography (chromatographie liquide de haute performance dénaturante)
DR:	direct repeats (répétitions directes)
DWP:	drinking water plant (station de potabilisation)
EB:	ethambutol (ethambutol)
EC:	<i>Escherichia coli</i>

Ef:	efficiency (efficacité)
EMA:	ethidium monoazide bromide (bromure de monoazide d'éthidium)
EN:	<i>Enterococcus</i>
ESAT-6:	6 kDa early secretory antigenic target
FAM:	6-carboxy fluorescein (6-carboxyfluorescéine)
FGM:	fast-growing mycobacteria (mycobactérie à croissance rapide)
FISH:	fluorescent <i>in situ</i> hybridization (hybridation <i>in situ</i> fluorescente)
FITC:	fluoresceine isothiocyanate-5 (isothiocyanate-5 de fluorescéine)
FRET:	fluorescence resonance energy transfer (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes)
FSH:	fluorescent sandwich hybridization (hybridation sandwich fluorescente)
FSM:	Falkinham's selective medium (milieu sélectif de Falkinham)
GC–MS:	gas chromatography–mass spectrometry (chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse)
GE:	genome equivalent (équivalent genome)
GLM:	generalized linear model (modèle linéaire généralisé)
HbhA:	heparin-binding hemagglutinin (hémagglutinine liant l'héparine)
HIV:	human immunodeficiency virus
HPLC:	high performance liquid chromatography (chromatographie liquide de haute performance)
ICP-OES:	inductively coupled plasma optical emission spectrometry (spectrométrie d'émission optique / plasma couplé par induction)
ideR:	iron-dependent regulatory function (système de régulation dépendant du fer)
IRT:	inhibitor removal technology® (technologie d'élimination d'inhibiteurs)
ITS:	internal transcribed spacer (espace transcrit interne)
JC:	Jukes-Cantor distance (distance de Jukes-Cantor)
K ₂ P	Kimura's Two-parameter (paramètre 2 de Kimura)
LAM:	lipoarabinomannan (lipoarabinomannane)
LI:	lipidic insert (lipide intercalant)
LJ:	Löwenstein-Jensen medium (milieu de Lowenstein-Jensen)
LOD:	limit of detection (limite de détection)
LOI:	loss on ignition (perte au feu)
LOQ:	limit of quantification (limite de quantification)
LpqH:	lipoprotein antigen precursor (précurseur d'antigène lipoprotéique)
MAA:	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> (<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>avium</i>)
MAC:	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> complex (complex <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>)
MAG:	mycolylarabinogalactan (mycoarabinogalactane)
MAH:	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>hominissuis</i>)

Liste des abréviations

MAIS:	<i>Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum</i> complex (complex <i>Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum</i>)
MAP:	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>)
MAS:	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> (<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>silvaticum</i>)
MCE:	mammalian cell entry (entrée dans les cellules de mammifère)
MFC:	<i>Mycobacterium fortuitum</i> complex (complexe <i>Mycobacterium fortuitum</i>)
MIRUs:	mycobacterial interspersed repetitive units (unités répétitives parsemées mycobactériennes)
MLEE:	multi-locus enzyme electrophoresis (électrophorèse multi-locus d'enzymes)
MLSA:	multi locus sequencing analysis (analyse de séquences multi-locus)
MOTT:	<i>Mycobacterium</i> other than <i>tuberculosis</i> (<i>Mycobacterium</i> autre que <i>tuberculosis</i>)
MPC:	<i>Mycobacterium parafortuitum</i> complex (complexe <i>Mycobacterium parafortuitum</i>)
MPN:	most probable number (nombre le plus probable)
MTC:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
MtC:	<i>Mycobacterium terrae</i> complex (<i>Mycobacterium terrae</i> complexe)
MY:	<i>Mycobacterium</i>
NCBI:	national center for biotechnology information (centre national américain d'information en biotechnologie)
NJ:	neighbor-joining (matrice de jonction de voisinage)
NTM:	non tuberculous mycobacteria (mycobactérie non-tuberculeuse)
OADC:	oleic acid, bovine albumin, sodium chloride, dextrose, catalase (acide oléique, albumine bovin, chlorure de sodium, dextrose, catalase)
OEOE:	Ogawa medium ofloxacin ethambutol (milieu d'Ogawa à l'ofloxacine éthambutol)
OEY:	Ogawa egg yolk medium (milieu au jaune d'œuf d'Ogawa)
PAH:	polycyclic aromatic hydrocarbons (hydrocarbures aromatiques polycycliques)
PANTA:	polymyxin B, amphotericin, nalidixic acid, de trimethoprim, azlocillin (polymyxine B, amphotéricine, acide nalidixique, triméthoprime, carboxy-pénicilline)
PANTAV:	polymyxin B, amphotericin, nalidixic acid, de trimethoprim, azlocillin, vancomycin (polymyxine B, amphotéricine, acide nalidixique, triméthoprime, carboxy-pénicilline, vancomycin)
PCA:	principal component analysis (analyse des composantes principales)
PCR:	polymerase chain reaction (polymérisation en chaîne)
PCR-REA:	polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis (polymérisation en chaîne et analyse par restriction enzymatique)
PE:	Pro-Glu (Proline-Glutamine)
PFGE:	pulsed field gel electrophoresis (électrophorèse en champs pulsés)
PO ₄ ³⁻ :	orthophosphates (orthophosphates)
POC:	particulate organic carbon (carbone organique particulaire)
PPE:	Pro-Pro-Glu (Proline-Proline-Glutamine)

PPEM:	potentially pathogenic environmental mycobacteria (mycobacteries environnementale potentiellement pathogène)
qPCR:	quantitative polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne quantitative)
r^2 :	correlation coefficient (coefficient de corrélation)
rep-PCR:	repetitive sequence typing (typage des séquences répétées)
RIDOM:	ribosomal differentiation of medical microorganisms (différentiation ribosomale des microorganismes médicaux)
RIF:	rifampicin (rifampicine)
RFLP:	restriction fragment length polymorphism (polymorphismes de longueur des fragments de restriction)
Rpf:	resuscitation promoting factor (facteur déclenchant la ressuscitation)
ROX:	6-carboxy-X-rhodamine (6-carboxy-X-rhodamine)
RT-PCR:	reverse transcriptase PCR (PCR en transcription inverse)
RT-qPCR:	reverse transcriptase quantitative PCR (PCR quantitative en transcription inverse)
RWTP:	rain water treatment plant (station de dépollution des eaux de pluviales)
SDS:	sodium dodecyl sulfate (dodécylsulfate de sodium)
SGM:	slow-growing mycobacteria (mycobactérie à croissance lente)
Sig:	sigma factor (facteur sigma)
Sp:	specificity (spécificité)
Ss:	sensitivity (sensibilité)
SSCP:	single-strand conformation polymorphism (polymorphisme de conformation de simple brin)
ST:	streptomycin (streptomycine)
TC:	total cells (cellules totales)
TET:	tetra-chloro-6-carboxyfluorescein (tetra-chloro-6-carboxyfluorescéine)
TGGE:	temperature gradient gel electrophoresis (électrophorèse de gel en gradient de température)
TKN:	total Kjeldahl nitrogen (azote Kjeldahl total)
T _m :	melting temperature (températures de fusion)
TSS:	total suspended solids (solides en suspension totaux)
tRFLP:	terminal restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de longs fragments de restriction terminaux)
TAMRA:	6-carboxy-tetramethylrhodamine (6-carboxy-tétraméthylrhodamine)
TTGE:	temporal temperature gradient gel electrophoresis (électrophorèse de gel en gradient temporel de température)
UPGMA:	unweighted pair group method with arithmetic mean (method non pondérée de groupage des paires par moyenne arithmétique)
VBNC:	viable but nonculturable (viable mais non-cultivable)
VNTR:	variable number of tandem repeat (variations du nombre de répétition en tandem)
WWTP:	waste water treatment plant (station d'épuration)

<i>atpE</i> :	adenosine-5'-triphosphate subunit C (sous-unité C de l'adénosine triphosphate)
<i>atpB</i> :	adenosine-5'-triphosphate subunit A (sous-unité A de l'adénosine triphosphate)
<i>bfrA</i> :	bacterioferritin (bactérioferritine)
<i>bfrB</i> :	ferritin (ferritine)
<i>cmaA1</i> :	cyclopropane mycolic acid A1 (acide mycolique cyclopropane A1)
<i>dps</i> :	decaprenyl diphosphate (décaprényl diphosphate)
<i>esx</i> :	early secretory system (système de sécrétion rapide)
<i>fad</i> :	fatty acid degradation operon (opéron de dégradation des acides gras)
<i>gyrA</i> :	gyrase A subunit (sous-unité A de la gyrase)
<i>gyrB</i> :	gyrase B subunit (sous-unité B de la gyrase)
<i>hsp65</i> :	65 kDa stress-heat shock protein (protéine de résistance aux chocs thermiques)
<i>ideR</i> :	iron-dependent regulatory function (système de régulation dépendant du fer)
<i>kstR</i> :	3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase (3-cétostéroïde Δ 1-déhydrogénase)
<i>lppM</i> :	lipoprotein M (lipoprotéine M)
<i>mce</i> :	mammalian cell entry (entrée dans les cellules de mammifères)
<i>murA</i> :	UDP-NAG transferase (transférase UDP-NAG)
<i>mbt</i> :	mycobactin (mycobactin)
<i>nidA</i> :	ring-hydroxylating dioxygenase α subunit (sous-unités α de la déshydrogénase des cycles aromatiques)
<i>nidB</i> :	ring-hydroxylating dioxygenase β subunit (sous-unités β de la déshydrogénase des cycles aromatiques)
<i>recA</i> :	homologous recombination (recombinase)
<i>relA</i> :	guanosine 3',5'-bispyrophosphate (guanosine 3',5'-bispyrophosphate)
<i>rpoB</i> :	RNA-polymerase (ARN polymerase)
<i>rrs</i> :	16S rRNA (ARNr 16S)
<i>rrl</i> :	23S rRNA (ARNr 23S)
<i>rrf</i> :	5S rRNA (ARNr 5S)
<i>sodA</i> :	superoxyde dismutase (superoxyde dismutase)
<i>tyrS</i> :	tyrosyl-tRNA synthetase (synthétase tyrosyl-tRNA)
<i>ure</i> :	urease operon (opéron uréase)
<i>virS</i> :	virulence factor (facteur de virulence)

« Lorsqu'un homme s'installe avec un travail dans un coin, il abandonne autant de vie qu'il acquiert de connaissance »

William Butler Yeats

INTRODUCTION GÉNÉRALE

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

Les besoins vitaux de l'Humain lui sont apportés par la Terre, qu'il doit par conséquent sauvegarder pour sa santé immédiate et celle des générations futures. Néanmoins, les activités de l'homme, tels que le développement des villes et l'intensification des élevages et cultures destinés à la consommation, ont un impact direct sur son environnement, en particulier sur l'eau et le sol des bassins versants, définis par l'ensemble des territoires drainés par un cours d'eau principal et ses affluents. Ainsi, la directive cadre sur l'eau (2000/60/CE) établit des objectifs de préservation et restauration de l'eau de surface et de l'eau souterraine d'ici 2015. Cette directive implique donc l'étude du flux et du comportement de polluants chimiques dans les bassins versants. En France, le bassin versant de la Seine est le plus anthropisé. Effectivement, dans sa partie Parisienne, il est constitué d'une zone urbaine très dense de plus de 10 millions d'habitants, entourée par des régions d'agriculture intensive.

Parmi les polluants microbiologiques de l'environnement, les mycobactéries non-tuberculeuses sont d'un intérêt grandissant. Certaines eaux de surface, comme les rivières, les lacs, les étangs, et les sources chaudes, ainsi que certains sols, sont considérés comme des sources majeures de mycobactéries non-tuberculeuses. Parmi les infections humaines causées par ces mycobactéries d'origine hydrique, qui par ailleurs sont pathogènes pour de nombreux animaux, les infections pulmonaires et cutanées sont souvent décrites. Cependant, leur cycle de vie dans l'environnement est mal connu, et requiert des outils analytiques qui ne sont actuellement pas adaptés aux échantillons environnementaux. Le présent travail propose donc d'améliorer les connaissances sur les mycobactéries non-tuberculeuses dans les bassins versants. Il s'intègre dans les programmes OPUR (Observatoire des Polluants Urbains en Ile-de-France) et PIREN-Seine (Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine), et se situe à leur interface.

Pour atteindre cet objectif, un l'état de l'art sur les mycobactéries dans les bassins versants a tout d'abord été dressé, il intègre leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques, génétiques, épidémiologiques, écologiques, ainsi que la description des outils analytiques permettant leur étude. Il constitue le cœur du premier chapitre de ce manuscrit.

Le second chapitre, lui, se focalise sur le développement d'outils de quantification des mycobactéries dans des échantillons environnementaux, et intègre la comparaison de méthodes de culture, de cibles moléculaires de quantification, et de méthodes d'extraction nucléaire. Il s'articule sous forme de trois publications :

Article ① Radomski N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moilleron et F.S. Lucas (2010). Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(11): 3514-3520 (doi: 10.1128/AEM.02659-09).

Article ② Radomski N., F.S. Lucas, R. Moilleron, E. Cambau, S. Haenn et L. Moulin (2010). Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(21): 7348-7351 (doi: 10.1128/AEM.00942-10).

Article ③ Radomski N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moilleron et F. Lucas (2010). Effective DNA extraction method for quantification of *Mycobacterium* spp. in surface water by real-time PCR. (soumis à *Canadian Journal of Microbiology*).

Les outils analytiques développés ont été ensuite appliqués à des échantillons de l'environnement pour décrire, dans un troisième chapitre, le comportement des mycobactéries à différents points stratégiques du cycle de l'eau en milieu urbain. Ainsi, le devenir des mycobactéries a-t-il été suivi dans une station d'épuration par temps sec à l'échelle des ouvrages. Ce suivi a été réalisé dans le cadre du thème 4 de la phase 3 du programme OPUR, qui porte sur l'efficacité épuratoire des filières de traitement des eaux résiduaires urbaines : aspects microbiologiques et physico-chimiques. De même, les apports diffus de temps de pluie ont été suivis à l'occasion d'une campagne sur la Marne, organisée dans le cadre du programme PIREN-Seine. Pour compléter ce suivi dans différents compartiments environnementaux, la relation entre composition de sols, *a priori* propices au développement des mycobactéries, et les niveaux de mycobactéries effectivement mesurés a été analysée. Ce dernier projet est le fruit d'une collaboration avec l'équipe du Pr. J.O. Falkinham III du Virginia Polytechnic Institute. Trois publications, synthétisant les résultats que nous avons obtenus, structurent ce chapitre :

Article ④ Radomski N., L. Betelli, R. Moilleron, S. Haenn, L. Moulin, E. Cambau, V. Rocher, A. Gonçalves et F.S. Lucas (2010). *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant during dry weather, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and *Enterococcus*. (soumis à *Environmental Science and Technology*).

Article ⑤ Radomski, N., E. Cambau, F.S. Lucas, S. Haenn, R. Moilleron, A. Pruden, J.O. Falkinham III et L. Moulin (2010). Factors affecting the mycobacteria densities in soils.

Article ⑥ Radomski, N., E. Cambau, S. Haenn, L. Moulin, R. Moilleron et F.S. Lucas (2010). Mycobacteria density decreases in surface water of urban, peri-urban and rural areas during storm weather.

Pour finir, le quatrième chapitre est réservé à une discussion sur la transposition des outils analytiques cliniques aux matrices environnementales, ainsi qu'à la proposition d'une nouvelle stratégie de développement d'outils moléculaires de détection de microorganismes dans l'environnement. Il est constitué d'un chapitre de livre, fruit de la collaboration avec le Pr. J.O. Falkinham III, et d'un article, qui résulte d'une collaboration qui a été initiée à mon initiative avec le Docteur M.A. Behr de l'Université de McGill et le Docteur F. Veyrier de l'Institut Pasteur de Paris :

Article ⑦ Radomski N., R. Moilleron, F.S. Lucas et J.O. Falkinham III (2011). Challenges in environmental monitoring of pathogens: Case study in *Mycobacterium avium*. A. Méndez-Vilas Eds. Badajoz, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2(2): 1551-1561 (ISBN 13: 978-84-614-6195-0).

Article ⑧ Radomski N., F. Veyrier, E. Cambau, R. Moilleron, L. Moulin, M.A. Behr, F.S. Lucas (2010). New strategy for *in silico* identification of exclusively conserved sequences in *Mycobacterium* spp. genomes.

« *L'art ne reproduit pas le visible, il le rend visible* »

Paul Klee

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART SUR LES MYCOBACTERIES DANS LES BASSINS VERSANTS

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

I / Les mycobactéries non-tuberculeuses

Sans parler de la lèpre, dont l'incidence en France métropolitaine n'est pas connue et dont la prévalence était estimée à 0,013 cas pour 10 000 habitants dans les territoires d'Outre-Mer entre 1995 et 1998 (Flageul 2009), il a été observé entre 1985 et 1995 une diminution des cas de tuberculose et, dans le même temps, une augmentation des cas de mycobactérioses au centre hospitalier universitaire de Nancy (Dailloux *et al.* 1999). Néanmoins, contrairement à la tuberculose qui est une maladie à déclaration obligatoire en France, et dont l'incidence était estimée à 8,5 cas pour 100 000 habitants en 2006 (5 336 déclarations) principalement dans les populations socio-économiquement vulnérables d'Ile-de-France et de Guyane (Che 2008), il n'existe pas actuellement d'évaluation de l'incidence des mycobactérioses à l'échelle nationale française. C'est en ce sens que parmi les trois types de pathologies causées par des mycobactéries distinctes, les mycobactérioses causées par les mycobactéries non-tuberculeuses (non tuberculous mycobacteria: NTM) sont d'un intérêt grandissant pour la santé publique en France. L'origine des NTM étant reconnue comme environnementale (Falkinham 2009), ce premier chapitre se focalisera donc sur l'état de l'art des connaissances sur les mycobactéries et plus particulièrement sur les NTM dans les bassins versants.

I.1 / Les généralités

I.1.a / La taxonomie

- ***Le genre *Mycobacterium****

D'après le Bergey's manuel (Murray *et al.* 1989), le genre bactérien *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille bactérienne fait partie du sous-ordre *Corynebacterineae*, de l'ordre *Actinomycetales*, de la sous-classe *Actinobacterineae*, et de la classe *Actinobacteria*. Les espèces du genre *Mycobacterium*, communément nommées mycobactéries, sont aussi rassemblées au sein du groupe *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium* (CNM), dans lequel a été ajouté dernièrement le genre *Rhodococcus* (Murray *et al.* 1989). Effectivement, les cellules des genres bactériens *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, et *Rhodococcus*, mais aussi le genre *Dietzia*, *Gordona* et *Tsukamurella* présentent un génome riche en bases nucléiques Guanine-Cytosine entre 48 et 73 % (Cocito *et al.* 1994 ; Gangadharam et Jenkins 1998a ; Prescott *et al.* 2003 ; Casas Botero *et al.* 2007 ; Euzéby 2010), ainsi qu'un niveau important d'acide mycolique (Barksdale et Kim 1977 ; Holt 1989 ; Gangadharam et Jenkins 1998a). En raison de ce niveau important en acide mycolique, les genres bactériens du groupe CNM, ainsi que les genres moins décrits *Dietzia*, *Gordona* et *Tsukamurella*, sont aussi nommés bacilles acido-alcool-résistants (acid-fast bacilli : AFB) en raison des caractéristiques particulières de leur membrane qui leur confèrent des propriétés tinctoriales.

- ***Les ensembles du genre *Mycobacterium****

Au sein du genre *Mycobacterium*, trois grands ensembles d'espèces sont décrits : les mycobactéries du complexe *tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex: MTC) qui sont responsables de la tuberculose telle que *M. tuberculosis* (aussi nommé bacille de Koch et anciennement nommé *Bacterium tuberculosis*), *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* et *M. pinnipedii* ; les mycobactéries responsables de la lèpre humaine et féline, respectivement *M. leprae* (aussi nommée Hansen et anciennement *Bacterium leprae*) et *M. lepraemurium* ; et les NTM, qu'il est encore possible de trouver sous d'autres nominations comme mycobactéries atypiques, mycobactéries environnementales potentiellement pathogènes (potentially pathogenic environmental mycobacteria: PPEM), ou *Mycobacterium* autres que *tuberculosis* (*Mycobacterium other than tuberculosis*: MOTT) (Inderlied *et al.* 1993 ; Caruso *et al.* 2009 ; del Rio Camacho *et al.* 2010). Il est à noter que, même si elles présentent des virulences atténuées, les souches vaccinales nommées bacilles de Calmette et Guérin (BCG) dérivent de l'espèce *M. bovis*, et sont donc classées dans le MTC.

- **Les complexes d'espèces de mycobactéries non-tuberculeuses**

Au sein des NTM, des ensembles d'espèces ou de sous-espèces sont aussi décrits sous l'appellation de complexe car les espèces les constituants sont en cours de description. Le plus connu est constitué de mycobactéries du complexe *avium-intracellulare* (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex: MAC), avec historiquement les espèces *M. intracellulare* (Cuttino et McCabe 1949) et *M. avium* (Thorel *et al.* 1990), et plus récemment les espèces *M. chimaera* (Tortoli *et al.* 2004), *M. colombiense* (Murcia *et al.* 2006), *M. bouchodurhonense*, *M. marseillense*, *M. timonense* (Ben Salah *et al.* 2009) et *M. vulneris* (van Ingen *et al.* 2009c). De plus, l'espèce *M. avium* comporte quatre sous-espèces génotypiquement distinct (Radomski *et al.* 2010) : *M. avium* ssp. *avium* (MAA), *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* ssp. *silvaticum* (MAS) (Thorel *et al.* 1990), et *M. avium* ssp. *hominissuis* (MAH) (Annexe 1).

Un second complexe de NTM intègre les mycobactéries du complexe *fortuitum* (*Mycobacterium fortuitum* complex : MFC), avec les deux espèces historiques *M. fortuitum* (Da Costa Cruz 1938) et *M. peregrinum* (Kusunoki et Ezaki 1992), ainsi que plus récemment les espèces *M. boenickei*, *M. brisbanense*, *M. houstonense* et *M. neworleansense*, auparavant connues sous le nom de biovar 3 (Schinsky *et al.* 2004). De plus, l'espèce *M. fortuitum* comprend deux sous-espèces nommées *M. fortuitum* ssp. *fortuitum* et *M. fortuitum* ssp. *acetamidolyticum* (Kusunoki et Ezaki 1992).

Un troisième complexe très proche des espèces du MFC, intègre les mycobactéries du complexe *parafortuitum* (*Mycobacterium parafortuitum* complex: MPC), avec les espèces *M. diernhoferi*, *M. parafortuitum* et *M. austroafricanum* (Tsukamura *et al.* 1965 ; Tsukamura *et al.* 1983c), et un quatrième complexe intègre les mycobactéries du complexe *terrae* (*Mycobacterium terrae* complex: MtC), avec les espèces *M. terrae*, *M. triviale* et *M. nonchromogenicum* (Tsukamura 1965 ; Wayne 1966 ; Kubica *et al.* 1970). Il est aussi à noter un ancien complexe intégrant les mycobactéries du complexe *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (*Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex: MAIS) (Kirschner *et al.* 1993 ; Wayne *et al.* 1993), qu'il est encore possible de trouver dans la littérature (van Ingen *et al.* 2009c).

- **Les espèces de mycobactéries non-tuberculeuses**

Sans parler du MTC dont les espèces ont toutes une croissance lente, ni du complexe lépreux dont les espèces ne sont pas cultivables *in vitro* (*M. leprae*) ou très difficilement (*M. lepraemurium*), les NTM sont divisées en deux grands ensembles : les NTM à croissance rapide (fast-growing mycobacteria: FGM) et les NTM à croissance lente (slow-growing mycobacteria: SGM). Il est communément admis que les NTM à croissance rapide sont visibles à l'œil nu avant 8 jours à 37°C sur le milieu Löwenstein-Jensen, alors que les NTM à croissance lente le sont après 7 jours dans les mêmes conditions (Euzéby 2010). Néanmoins, cette segmentation repose en réalité sur plusieurs critères tels que la croissance, dans certaines conditions de substrats et de températures, la pigmentation, ainsi que la résistance et la tolérance à certains composés. A l'exception de l'espèce de *M. pulveris* (Tsukamura *et al.* 1983a) qui est considérée comme une NTM à croissance intermédiaire, la dernière estimation du nombre d'espèce et de sous-espèces appartenant au genre *Mycobacterium* recense 78 NTM à croissance rapide et 79 NTM à croissance lente (Annexe 2). Ce recensement des espèces ou sous-espèces du genre *Mycobacterium* arrive à une estimation de 158 NTM (Annexe 2), soit au total 167 espèces différentes du genre *Mycobacterium*, dont seulement 41 espèces ou sous-espèces, ont été officialisées dans la dernière liste des noms bactériens acceptés (Skerman *et al.* 1989).

I.1.b / Les caractéristiques morphologiques

- **Organisation de la paroi**

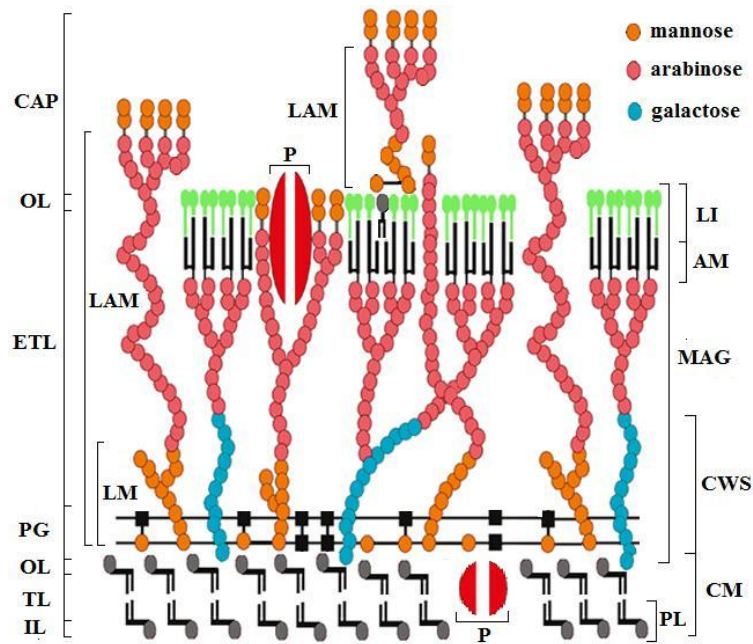
Les mycobactéries sont des AFB mesurant entre 1 et 10 µm de longueur et 0,2 et 0,6 µm de diamètre (Prescott *et al.* 2003 ; Bruijnesteijn van Coppenraet 2009), avec une épaisseur du peptidoglycane variant de 4 à 10 nm (Takade *et al.* 2003). Les bacilles du genre *Mycobacterium* peuvent être de forme droite incurvée ou spiralée (Prescott *et al.* 2003). Néanmoins, la forme du bacille n'est pas un critère d'identification admis. La structure de la paroi des mycobactéries présente des points communs avec celle des bactéries à Gram positif. Contrairement aux bactéries à Gram positif classiques, la paroi des mycobactéries, tout comme les AFB, a une organisation tripartite, avec une membrane cytoplasmique accompagnée d'un peptidoglycane, d'une couche pariétale de mycolate transparente aux électrons et d'une couche externe (Legrand *et al.* 1999).

- **Les polyosides pariétaux de la paroi**

Chez les mycobactéries, cette couche externe organisée comme une monocouche structurée, se comporte comme une bicouche fonctionnelle (Legrand *et al.* 1999) constituée de polyosides pariétaux mycoarabinogalactane (MAG) et lipoarabinomannane (LAM) qui forment une pseudocapsule au-dessus de la couche externe (Legrand *et al.* 1999 ; Alsteens *et al.* 2008 ; Verbelen *et al.* 2009). Ces deux polyosides pariétaux joueraient un rôle majeur dans la virulence des mycobactéries, et dans la résistance naturelle de ces AFB aux antituberculeux classiques. Le polyoside pariétal MAG est un polymère linéaire de galactose fixé à la bicouche phospholipidique de la membrane cytoplasmique, prolongé par un polymère d'arabinose ramifié ou non, et se terminant par des acides mycoliques (AM) et des lipides intercalant (LI) qui tapissent la surface de la paroi (Figure 2). Le polyoside pariétal LAM est un polymère linéaire ou ramifié de mannose fixé par liaison ester aux phospholipides du peptidoglycane ou à des phosphorites aux acides mycoliques, prolongé par un polymère linéaire ou ramifié d'arabinose, et se terminant par des dimères de mannose (Figure 2). Le LAM jouerait un rôle dans la cohésion de la paroi (Euzéby 2010). Les acides mycoliques sont des acides 3-hydroxy carboxyliques avec une chaîne aliphatique en position 2 (R1-CH(OH)-CH(R2)-COOH), et un haut poids moléculaire (entre 30 et 90 atomes de carbones). Les acides mycoliques de 60 et 90 atomes de carbone, avec au maximum deux insaturations, sont caractéristiques du genre *Mycobacterium* (Gangadharam et Jenkins 1998a ; Goodfellow et Magee 1998), alors que les acides mycoliques de 22 à 72 atomes de carbone, avec au maximum 5 insaturations, sont rencontrés dans les *Actinobacteria* apparentées au genre *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordoniae*, *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella* (Gangadharam et Jenkins 1998a). Concernant le genre *Mycobacterium*, 7 formes structurales d'acides mycoliques peuvent composer la surface du bacille (Figure 2). Cette structure très particulière de la paroi mycobactérienne, qui peut contenir jusqu'à 60 % de lipides, explique, au moins partiellement, les propriétés tinctoriales, la pathogénicité et la résistance à divers antibiotiques et aux agents chimique (Minnikin 1982).

- **Les autres constituants de la paroi**

La paroi des mycobactéries, en plus des polyosides pariétaux, est constituée d'une matrice de phospholipides simples ou contenant du mannose, des molécules amphiphiles comme les sulfolipides, les phénolglycolipides et les dimycolates de tréhalose, ainsi que de protéines comme les porines, et de peptidoglycolipides nommés mycosides (Euzéby 2010).



AM : acide mycolique ; CAP : capsule ; CM : membrane cytoplasmique ; CWS : squelette de la paroi ; ETL : couche pariétale de mycolate transparente aux électrons ; IL : couche interne ; LAM : lipoarabinomannane ; LI : lipide intercalant ; LM : lipomannane ; MAG : mycoarabinogalactame ; OL : couche externe ; P : porine ; PG : peptidoglycane ; PL : phospholipide ; TL : couche membranaire transparente aux électrons.

Figure 1 : Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne (Legrand *et al.* 1999 ; Alsteens *et al.* 2008 ; Verbelen *et al.* 2009)

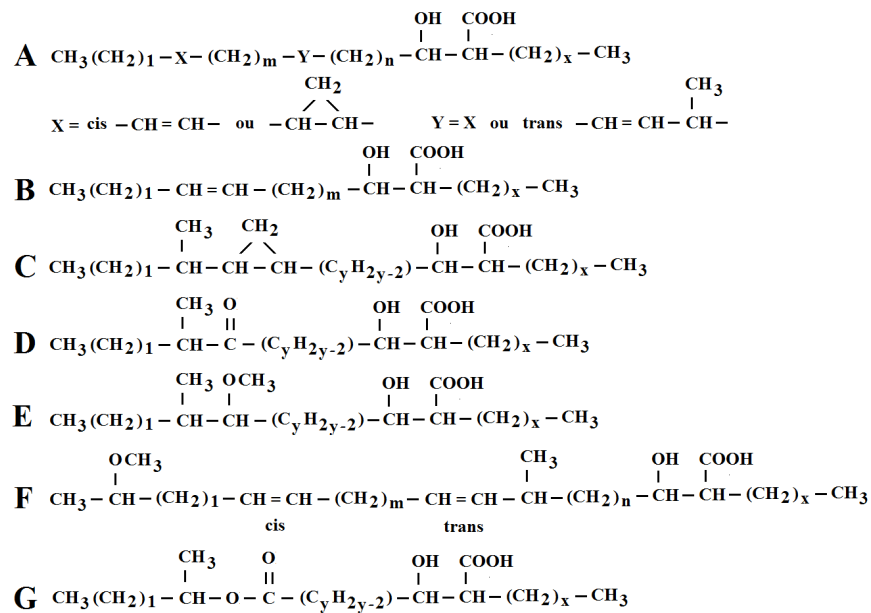


Figure 2 : Structures types d'acide mycolique : α -mycolate (A), α' -mycolate (B), époxy-mycolate (C), céto-mycolate (D), méthoxy-mycolate (E), γ -méthoxy-mycolate (F) et éther de mycolate (G) ; les valeurs de l, m, n et x varient de 11 à 35 atomes de carbone (Gangadharam et Jenkins 1998a)

I.1.c / Les caractéristiques physiologiques

- ***Un métabolisme hétérotrophe intermédiaire***

Les mycobactéries ont un métabolisme hétérotrophe intermédiaire aux bactéries prototrophes et auxotrophes (Ramakrishnan *et al.* 1972). Effectivement, les mycobactéries sont aérobies ou microaérophiles, chimiotrophes (source d'énergie par oxydation), organotrophes (donneur d'électron organique), hétérotrophes (source de carbone organique), et pour la plupart relativement auxotrophes (Euzéby 2010). Concernant le métabolisme des glucides, les mycobactéries peuvent assimiler les sucres simples par voie oxydative en utilisant la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates, et présentent un cycle de Krebs (Ramakrishnan *et al.* 1972). Elles possèdent par conséquent une catalase qui leur permet de contrer l'accumulation de peroxyde d'hydrogène issu de la chaîne respiratoire. Chez les mycobactéries, le métabolisme des lipides se fait par β -oxydation, et des biosynthèses lipidiques sont présentes pour produire les acides gras (Ramakrishnan *et al.* 1972). Quatre systèmes d'élongation des chaînes d'acides gras linéaire saturés coexisteraient, un système aérobie de production d'acides gras insaturés, ainsi que trois systèmes de ramification d'acides gras, l'un pour les ramifications méthylées simples au centre des chaînes, le deuxième pour les ramifications méthylées multiples du côté carboxyle des chaînes, et le troisième pour la ramification des acides gras présentant de longues chaînes et une ou deux fonction oxygénées (Figure 2). Des biosynthèses de lipides particuliers sont aussi présentes telles que les synthèses de lipopolysaccharides (MAG), de phénolglycolipides (mycosides) et de phospholipides (Ramakrishnan *et al.* 1972).

- ***Des vitesses de croissance faibles***

Les NTM sont considérées comme mésophiles, avec une multiplication débutant entre 18°C et 22°C, optimale entre 28°C et 31°C, et s'arrêtant entre 41°C et 52°C (Kazda 2000). Seule la NTM à croissance rapide *M. psychrotolerans* est capable de se multiplier à des températures très basses de l'ordre de 4 à 37°C (Trujillo *et al.* 2004). Il n'existe pas de donnée sur le temps de génération des NTM dans l'environnement. Néanmoins dans des conditions optimales en laboratoire, les temps de génération vont de 2 heures pour la NTM à croissance rapide *M. smegmatis*, à 21 heures pour la NTM à croissance lente *M. aurum*, ce qui est comparable au temps de génération de 24 heures de la mycobactérie à croissance lente du MTC *M. tuberculosis* (Hiriyanna et Ramakrishnan 1986 ; Williams *et al.* 1998). Des exceptions sont aussi à noter comme les NTM à croissance lente *M. marinum* dont le temps de génération n'est que de 4 à 6 heures, et *M. avium* ssp. *paratuberculosis* dont le temps de génération peut aller jusqu'à 7 jours dans des conditions optimales de laboratoire (Rybniker *et al.* 2003 ; Harris *et al.* 2005).

- ***Des propriétés caractéristiques des colonies***

En fonction des milieux solides de culture utilisés (Euzéby 2010), les différentes espèces de mycobactérie donnent des colonies lisses ou rugueuses, présentant une taille importante (colonie eugonique) ou non (colonie dysgonique). Certaines espèces produisent des pigments caroténoïdes non diffusibles à la lumière (espèce photochromogène) ou à l'obscurité (espèce scotochromogène), et d'autres non (achromogène).

I.1.d / Les caractéristiques génétiques

La comparaison des génomes de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* et MAP, montre que ces derniers présentent des voies similaires de fonctionnement, concernant le métabolisme énergétique, la biosynthèse des acides aminés, la biosynthèse des cofacteurs, le métabolisme nucléotidique, et le métabolisme des macromolécules (Marri *et al.* 2006). De plus, en comparaison à d'autres genres bactériens, le genre *Mycobacterium* présente les caractéristiques génétiques suivantes.

- ***L'importance des capacités codantes***

Mise à part *M. leprae* qui possède un génome de plus petite taille que les autres mycobactéries, il est remarquable que les génomes des espèces du MTC et des NTM aient une capacité codante importante allant, par exemple, de 92,4 % pour *M. smegmatis* à 73,4 % pour *M. ulcerans* (Tableau 1).

Tableau 1 : Densité codante et capacité codante de génomes mycobactériens séquencés entièrement

Espèce du genre <i>Mycobacterium</i>	Référence	Taille du génom (pb)	Nombre de phase ouverte de lecture	Densité codante (pb par gène)	Taille moyenne des gènes (pb)	Capacité codante (%)
<i>M. abscessus</i>	(Ripoll <i>et al.</i> 2009)	5067172	4920	1030	958	93,0
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	(Li <i>et al.</i> 2005)	4829781	4350	1112	1012	91,3
<i>M. bovis</i>	(Garnier <i>et al.</i> 2003)	4345492	3953	1099	995	90,6
<i>M. gilvum</i>	(Ripoll <i>et al.</i> 2009)	5619607	5241	1072	986	92,0
<i>M. leprae</i>	(Stinear <i>et al.</i> 2010)	3268203	1605	2036	1010	49,6
<i>M. marinum</i>	(Stinear <i>et al.</i> 2010)	6636827	5424	1233	1101	89,3
<i>M. smegmatis</i>	(Li <i>et al.</i> 2005)	6988209	6897	1013	936	92,4
<i>M. tuberculosis</i>	(Cole <i>et al.</i> 1998)	4411532	3959	1114	1012	90,8
<i>M. ulcerans</i>	(Stinear <i>et al.</i> 2010)	5631606	4160	1353	979	73,4
<i>M. vanbaalenii</i>	(Ripoll <i>et al.</i> 2009)	6491865	5979	1086	988	91,0

- ***La variabilité des capacités de mutabilité***

Il est remarquable que les espèces pathogènes intracellulaires strictes au sein des mycobactéries, à savoir celles responsables de la lèpre et de la tuberculose, aient un matériel génétique faiblement mutable suggérant que ces pathogènes ont développé des mécanismes de conservation de leur génome afin de se prémunir des attaques de l'environnement phagocytaire de la cellule hôte (Clark-Curtiss 1990). Par opposition, la diversité des espèces de NTM (Annexe 2), ainsi que leur taille de génome relativement plus importante que les espèces pathogènes intracellulaires strictes (Fogel *et al.* 1999), suggèrent qu'elles ont une mutabilité plus importante afin de développer divers types de mécanismes leur permettant de s'adapter à différentes niches écologiques dans l'environnement. Par ailleurs, il est à noter que des événements de recombinaisons homologues sont détectables à la fois chez les mycobactéries à croissance rapide et à croissance lente (Baulard *et al.* 1996).

- ***Les possibilités de transferts horizontaux de gènes***

Des éléments de prophages sont détectables dans les génomes des NTM *M. abscessus*, *M. marinum* et *M. ulcerans* qui en contiendraient respectivement 4, 10 et 2 (Ripoll *et al.* 2009). Depuis les récents projets de séquençage de l'ensemble du génome de certaines espèces de NTM, la comparaison de ces derniers est désormais possible. L'une de ces études souligne que l'absence de gène codant pour des enzymes de restriction de l'ADN dans les génomes de MAP par comparaison aux génomes de *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. leprae*, pourrait suggérer l'existence d'un taux important de transfert de gènes pour cette espèce du MAC (Marri *et al.* 2006). Une autre étude de comparaison de génomes mycobactériens a

permis de décrypter à différentes strates phylogéniques 137 transferts horizontaux de gènes entre *M. tuberculosis* H37Rv et des espèces de NTM à croissance lente (Veyrier *et al.* 2009). Plus précisément, ce décryptage a mis en évidence des gènes orthologues (gènes homologues de deux espèces et descendant d'une unique séquence présente chez leur dernier ancêtre commun) codant le fonctionnement métabolique et la modification des lipides des mycobactéries, ce qui a corroboré l'hypothèse concernant les transferts horizontaux de gènes entre *M. tuberculosis* H37Rv et certaines NTM à croissance lente reconnues comme potentiellement pathogènes. En particulier, 28 gènes de *M. tuberculosis* H37Rv ont été acquis de l'ancêtre commun des mycobactéries à croissance lente étudiées (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. intracellulare*), 40 gènes acquis de l'ancêtre commun de la lignée *M. marinum* ; *M. ulcerans* ; *M. kansasii* ; *M. tuberculosis*, 14 gènes acquis de l'ancêtre commun de la lignée *M. kansasii* ; *M. tuberculosis*, ainsi que 55 gènes acquis spécifiquement de l'ancêtre de l'espèce actuelle de *M. tuberculosis* (Veyrier *et al.* 2009). Par ailleurs, une autre étude vient de détecter dans le génome entier récemment séquencé de la NTM à croissance rapide *M. abscessus*, des transferts horizontaux de gènes acquis de bactéries environnementales génétiquement proches ou non, comme les Actinomycètes *Rhodococcus* et *Streptomyces*, ainsi que des bactéries pathogènes fréquemment isolées de fibroses kystiques comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* (Ripoll *et al.* 2009). Ces gènes codent la biosynthèse du colorant bactéricide phénazine et de l'acide phénacétique, le catabolisme de l'acide homogentisique, ainsi que des processus de dégradation de l'ADN (Ripoll *et al.* 2009).

- **L'importante variabilité des polarités de transcription**

Le séquençage de l'ensemble du génome de *M. tuberculosis* H37Rv a permis de mettre en évidence que seulement 59 % des gènes étaient transcrits dans la même polarité contre 75 % chez *Bacillus subtilis* dont la croissance est nettement plus rapide. Cette observation a initialement conduit à l'hypothèse que cette variabilité des polarités de transcription, allant de paire avec les capacités codantes des mycobactéries (Tableau 1), pouvait expliquer leur faible vitesse de croissance (Cole *et al.* 1998). Cette observation a aussi été faite suite au séquençage de la totalité du génome de la NTM à croissance lente *M. avium* ssp. *paratuberculosis* qui présente aussi 59 % de ces gènes transcrits avec la même polarité (Li *et al.* 2005). Néanmoins, ces auteurs ont aussi fait remarquer que *Escherichia coli*, qui a aussi une vitesse de croissance nettement plus importante que celle des mycobactéries, ne présente que 55 % de ces gènes transcrits avec la même polarité, et donc que ce facteur ne pouvait pas expliquer à lui seul la croissance faible des mycobactéries (Li *et al.* 2005).

- **Une variabilité de la taille de l'hélice 18 de l'ARNr 16S**

Le séquençage du gène *rrs* (16S rRNA) codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomale a permis de confirmer que les mycobactéries appartenaient bien à un même genre bactérien, et également que la segmentation entre les mycobactéries à croissances lente et rapide qui avait été faite initialement sur la base des observations physiologiques (Stahl et Urbance 1990 ; Shinnick et Good 1994). Effectivement, contrairement aux mycobactéries à croissance rapide, les mycobactéries à croissance lente se caractériseraient par une courte ou longue hélice 18 (Menendez *et al.* 2002 ; Tortoli 2006), sur la base du modèle de la structure secondaire de l'ARNr 16 proposé par Kempell *et al.* pour l'espèce de référence *M. tuberculosis* (Kempell *et al.* 1992). C'est en ce sens que la recherche des différences entre les mycobactéries à croissances lente et rapide s'est focalisée sur l'opéron ribosomique.

- **La faiblesse des copies de l'opéron ribosomique**

Alors qu'aucune différence n'est remarquable entre la taille des génomes des NTM à croissance rapide et lente (Tableau 2), la majorité des NTM à croissance lente ne possèdent qu'une seule copie de l'ARNr 16S, et la majorité des mycobactéries à croissance rapide en

possèdent deux (Bercovier *et al.* 1986). Certaines exceptions sont à noter comme les NTM à croissance rapide *M. chelonae*, *M. abscessus* et *M. alvei* qui possèdent une copie de l'ARNr 16S (Domenech *et al.* 1994 ; Wallace *et al.* 1996 ; Menendez *et al.* 2002), et les NTM à croissance lente *M. terrae* et *M. celatum* qui en possèdent deux différentes (Ninet *et al.* 1996 ; Reischl *et al.* 1998b). Néanmoins, les ARNr 16S en deux exemplaires sont généralement identiques ou très similaires au sein des espèces (Turenne *et al.* 2001). L'opéron *rrn* codant les sous-unités 16S (16S rRNA: *rrs*), 23S (23S rRNA: *rrl*) et 5S (5S rRNA: *rrf*) du ribosome mycobactérien est nommé opéron *rrnA*, et est situé en aval du gène *murA* (UDP-NAG transférase) codant pour la transférase UDP-NAG. Le second opéron, qui est présent chez des mycobactéries à croissance rapide, est nommé *rrnB*, et est situé en aval du gène *tyrS* (tyrosyl-tRNA synthetase) codant pour la synthétase tyrosyl-tRNA (Menendez *et al.* 2002 ; Stadthagen-Gomez *et al.* 2008). L'étude effectuée sur l'espèce à croissance lente *M. celatum* qui possède deux opérons *rrs* comme les mycobactéries à croissance rapide, indique que l'ancêtre commun des mycobactéries possédait les opérons *rrnA* et *rrnB* et que la perte de l'opéron *rrnB* aurait engendré l'apparition des mycobactéries à croissance lente (Stadthagen-Gomez *et al.* 2008). Parmi les espèces de NTM dont le nombre de copies de l'ARNr 16S est connu, 80 % des espèces à croissance rapide en possèdent une copie (12 espèces sur 15) et 71 % des espèces à croissance lente en possèdent deux copies (5 espèces sur 7).

Tableau 2 : Taille du génome et nombre de copies de gènes dans l'opéron *rrn* de mycobactéries non-tuberculeuses à croissances rapide (A) et lente (B)

Espèce	Taille du génome		Nombre d'éléments dans l'opéron <i>rrn</i>					
	kpb	Référence	16S	ITS	23S	5S	ARNt	Référence
A								
<i>M. abscessus</i>	5067	(Ripoll <i>et al.</i> 2009)	1				47	(Ripoll <i>et al.</i> 2009)
<i>M. agri</i>			2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. alvei</i>			1					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. chelonae</i>	4045	(Fogel <i>et al.</i> 1999)	1					(Domenech <i>et al.</i> 1994)
<i>M. diernhoferi</i>			2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. fortuitum</i>	5000	(Fogel <i>et al.</i> 1999)	2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. gilvum</i>	5619	(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)	2		2	2	46	(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)
<i>M. mucogenicum</i>			2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. peregrinum</i>			2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. phlei</i>	6311	(Fogel <i>et al.</i> 1999)	2	2	2	2		(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)
<i>M. porcinum</i>			2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. senegalense</i>			2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
<i>M. smegmatis</i>	7168	(Fogel <i>et al.</i> 1999)	2	2	2	2	47	(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)
<i>M. vaccae</i>	4045	(Fogel <i>et al.</i> 1999)						
<i>M. vanbaalenii</i>	6491	(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)	2		2	2	49	(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)
<i>M. wolinskyi</i>			2					(Menendez <i>et al.</i> 2002)
B								
<i>M. avium</i>	5838	(Fogel <i>et al.</i> 1999)	1	1	1	1	46	(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)
<i>M. celatum</i>			2					(Reischl <i>et al.</i> 1998b)
<i>M. farcinogenes</i>	7023	(Fogel <i>et al.</i> 1999)						
<i>M. intracellulare</i>			1	1	1	1		(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)
<i>M. gastri</i>	6796	(Fogel <i>et al.</i> 1999)						
<i>M. gordonae</i>	7395	(Fogel <i>et al.</i> 1999)						
<i>M. intracellulare</i>	5016	(Fogel <i>et al.</i> 1999)	1					(Bercovier <i>et al.</i> 1986)
<i>M. kansasii</i>	6197	(Fogel <i>et al.</i> 1999)						
<i>M. marinum</i>	5825	(Fogel <i>et al.</i> 1999)	1				46	(Ripoll <i>et al.</i> 2009)
<i>M. scrofulaceum</i>	5639	(Fogel <i>et al.</i> 1999)						
<i>M. terrae</i>			2					(Ninet <i>et al.</i> 1996)
<i>M. ulcerans</i>	5631	(Klappenbach <i>et al.</i> 2001)	1		1	1	45	
<i>M. xenopi</i>	5324	(Fogel <i>et al.</i> 1999)						

• **Une variabilité du nombre de promoteurs des opérons *rrs***

Plusieurs études rapportent que l'opéron *rrnB* des mycobactéries ne présente qu'un seul promoteur qu'elle soit à croissance rapide ou lente, alors que l'opéron *rrnA* des mycobactéries à croissance rapide possède plusieurs promoteurs (Tableau 3). Par antagonisme à l'observation qu'il existe plus de promoteurs sur l'opéron *rrnA* que sur l'opéron *rrnB*, il semble que ce dernier pour la NTM à croissance rapide *M. fortuitum* contribue plus à la

production de pré-ARN que son opéron *rrnA* (Menendez *et al.* 2002). Il semble donc difficile d'affirmer que les vitesses de croissance des NTM soient uniquement la conséquence d'un nombre de promoteur sur l'opéron *rrnA* supérieur à celui observé sur l'opéron *rrnB*. Par ailleurs, l'opéron *rrnA* des mycobactéries à croissance rapide possède d'avantage de promoteurs lorsque l'espèce ne possède pas l'opéron *rrnB*, ce qui est le cas pour les espèces *M. chelonae* et *M. abscessus* (Tableau 3). Cette observation a amené l'hypothèse selon laquelle les mycobactéries à croissance lente, ne possédant pas l'opéron *rrnB*, limitaient ce déficit par plus de promoteurs à l'opéron *rrnA* que n'en ont les mycobactéries à croissance rapide possédant l'opéron *rrnB* (Gonzalez-y-Merchand *et al.* 1997).

Tableau 3 : Nombre de promoteurs des opérons *rrnA* et *rrnB* de mycobactéries à croissance rapide et à croissance lente possédant ou non (na : non applicable) l'opéron *rrnB*

Croissance et nombre d'opérons <i>rrn</i>	Espèce	Nombre de promoteurs		Référence
		<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	
Rapide à deux opérons	<i>M. phlei</i>	3	1	(Gonzalez-y-Merchand <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. smegmatis</i>	3	1	(Menendez <i>et al.</i> 2002)
	<i>M. fortuitum</i>	4	1	(Menendez <i>et al.</i> 2002)
	<i>M. neoaurum</i>	3	1	(Gonzalez-y-Merchand <i>et al.</i> 1997)
Rapide à un opéron	<i>M. chelonae</i>	5	na	(Gonzalez-y-Merchand <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. abscessus</i>	5	na	(Gonzalez-y-Merchand <i>et al.</i> 1997)
Lente à deux opérons	<i>M. celatum</i>	2	1	(Stadhagen-Gomez <i>et al.</i> 2008)
Lente à un opéron	<i>M. tuberculosis</i>	1	na	(Gonzalez-y-Merchand <i>et al.</i> 1997)

I.2 / L'épidémiologie

I.2.a / Le pouvoir pathogène

Les mycobactéries peuvent être regroupées en fonction de leur pouvoir pathogène. Certains auteurs parlent de l'ensemble des mycobactéries pathogènes obligatoires en y intégrant les espèces du MTC et *M. leprae*, de l'ensemble des mycobactéries potentiellement pathogènes en y intégrant les NTM *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. malmoense*, *M. xenopi* et *M. haemophilum*, ainsi que de l'ensemble des mycobactéries saprophytes environnementales qui intégrerait l'ensemble des autres espèces de NTM (Kazda 2009 ; Kazda et Pavlik 2009 ; Pavlik *et al.* 2009). D'autres auteurs parlent de l'ensemble des mycobactéries spécifiquement pathogènes en y regroupant les espèces du MTC, *M. leprae*, *M. ulcerans* et *M. marinum* car elles provoquent des pathologies caractéristiques connues sous les appellations respectives de tuberculose, lèpre, ulcère de Buruli et granulome de piscine, ainsi que de l'ensemble des mycobactéries pathogènes opportunistes en y regroupant les espèces *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. haemophilum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. genavense* et *M. asiaticum* (Gangadharam et Jenkins 1998a). Il est aussi possible de trouver dans la littérature les espèces du MTC, l'espèce *M. leprae*, ainsi que les espèces de NTM *M. ulcerans*, *M. kansasii* et *M. haemophilum*, regroupées dans l'ensemble des mycobactéries pathogènes obligatoires par opposition aux autres NTM considérées comme provenant de l'environnement (Kazda 2000). Il n'y a donc pas de consensus sur la pathogénicité des NTM. Effectivement, certaines NTM peuvent coloniser les surfaces cutanées, les muqueuses ou les sécrétions biologiques sans provoquer de maladie (Hopewell et Bloom 2000), mais rares sont les espèces de NTM qui n'ont jamais été décrites dans des cas infectieux humains ou animaux (Tortoli 2006).

I.2.b / L'origine environnementale

En l'absence de transmissions inter-humaines connues (Radomski *et al.* 2010), il semblerait que l'homme, au même titre que les animaux, soit contaminé par des NTM provenant de l'environnement (Annexe 1). Effectivement, les descriptions des espèces NTM ont été faites à partir d'isollements de cas infectieux d'humains ou d'animaux, que l'on appelle

en fait mycobactérioses, ou à partir d'isolements de l'environnement (Annexe 2). Par exemple, une étude de cohorte effectuée avec des tests cutanés de recherche d'antigènes chez la population en Floride indique que le sol est un réservoir majoritaire de la NTM *M. avium*, associée à des pathologies humaines, et que les personnes ayant des activités agricoles sont les plus exposées à l'infection (Reed *et al.* 2006). Par ailleurs, une étude de comparaison de séquences nucléiques, à Rio de Janeiro, rapporte que les espèces de NTM isolées de cas humains et de l'environnement sont souvent semblables (Senna *et al.* 2008). Dans le cas présent, les NTM d'origine environnementale avaient été isolées de l'eau, du sol, de fèces bovines et de porcs. Les isolats environnementaux présentant des similarités avec les isolats cliniques avaient été majoritairement attribués aux NTM *M. avium* ssp. et *M. fortuitum* (Senna *et al.* 2008). Bien que l'environnement semble être une source majeure des infections à NTM, par comparaison avec des isolats humains et animaux par polymorphismes de longueur des fragments de restriction (restriction fragment length polymorphism: RFLP) et variations du nombre de répétition en tandem et des unités répétitives parsemées mycobactériennes (variable number of tandem repeat- mycobacterial interspersed repetitive units: VNTR-MIRUs), il a été démontré lors de mon master que des isolats de MAH issus de cas humains ou animaux présentaient des combinaisons de profils génétiques identiques ou similaires (Annexe 1), et donc que le risque zoonotique n'était pas à exclure (Radomski *et al.* 2010). En Finlande, une étude de comparaison d'isolats humains, animaux et environnementaux par analyse des lipides membranaires, tests conventionnels et séquençage du gène *rrs* et de l'espace transcrit interne (internal transcribed spacer: ITS), indique que l'eau d'un ruisseau pourrait être une origine majeure de mycobactérioses humaines et animales, en particulier l'espèce *M. bohemicum* dont les isolats humains et environnementaux présentaient des profils identiques (Torkko *et al.* 2002).

I.2.c / L'incidence

- **Mondiale**

Même si l'organisation mondiale pour la santé a déclaré les NTM pathogènes émergents dans l'eau en 2004 (Pedley *et al.* 2004), il n'y a pas d'évaluation mondiale de l'incidence des mycobactérioses pour chaque espèce de NTM. Néanmoins, la mycobactériose majeure sur le globe, provoquée par *M. kansasii*, représente environ 11,6 cas pour 100 000 habitants en 2009 (Kazda et Pavlik 2009), soit environ 788 800 cas dans le monde si l'on considère que la population mondiale en 2009 était d'environ 6,8 milliards d'individus. A titre de comparaison, ce chiffre est supérieur à l'incidence de la lèpre qui atteignait 286 000 cas en 2004 et 219 826 cas dans l'hémisphère sud en 2006 (Kazda et Pavlik 2009), et très inférieur à l'incidence de la tuberculose, déclarée priorité mondiale par l'organisation mondiale pour la santé, estimée actuellement à environ 1,7 milliard d'humains infectés sur le globe, majoritairement en Afrique, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique Ouest (Gangadharam et Jenkins 1998b).

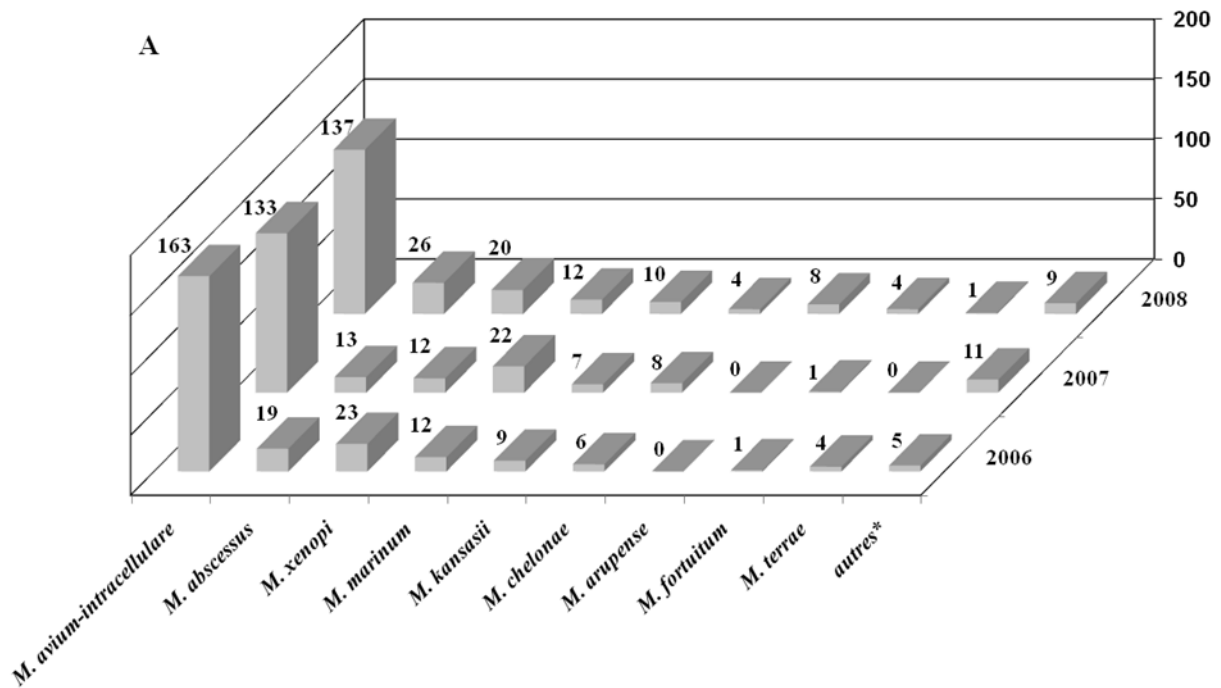
- **Française**

En 2006, 2007 et 2008, le réseau Azay de surveillance des mycobactérioses en France (Maugein et Bauriaud 2009) a recensé respectivement 242, 207 et 231 cas sur 20 centres hospitaliers, majoritairement causés par les espèces *M. avium-intracellulare*, et dans une moindre mesure par les espèces *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. kansasii* et *M. chelonae* (Figure 3A). Sans prendre en compte les hôpitaux locaux, les centres hospitaliers spécialisés en psychiatrie, les centres de lutte contre le cancer, ainsi que les établissements de lutte contre les maladies mentales et les établissements de soins de courte, moyenne et longue durées, l'Institut national de la statistique et des études économiques recensait en France 527 centres hospitaliers publics en 2007. Si l'on considère que ces centres hospitaliers ont la même capacité d'accueil, ce qui ne reflète pas la réalité, il serait donc possible d'estimer à au

moins 5 000 les cas de mycobactérioses en France pour l'année 2007, toutes espèces de NTM confondues hors établissements privés.

I.2.d / Les formes de mycobactériose

Le recensement des mycobactérioses en France entre 2006 et 2008 par le réseau Azay de surveillance des mycobactérioses (Maugein et Bauriaud 2009), indique que les formes pulmonaires sont prédominantes et majoritairement provoquées par *M. avium-intracellulare*, et, dans une moindre mesure, par *M. abscessus*, *M. xenopi* et *M. kansasii* (Figure 3B). Les autres formes de mycobactériose sont moins fréquentes et regroupent des formes cutanées provoquées principalement par *M. marinum* et *M. chelonae*, des formes disséminées provoquées par *M. avium-intracellulare*, des lymphadénites provoquées par *M. avium-intracellulare* principalement chez l'enfant, et des formes articulaires rares provoquées principalement par *M. xenopi* et *M. arupense* (Figure 3B). Ces observations suggèrent des voies d'exposition majoritairement respiratoires et dans une moindre mesure cutanées.



* *M. celatum*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. haemophilum*, *M. houstonense*, *M. malmoense*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. triplex*.

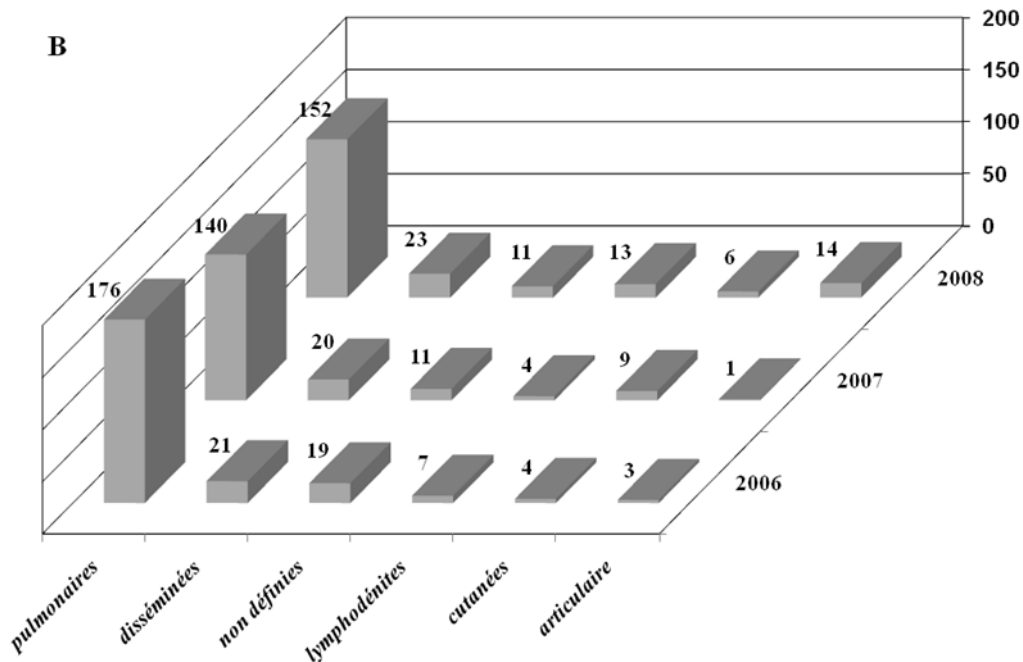


Figure 3 : Synthèse du nombre de cas (A) et de forme (B) de mycobactérioses humaines recensées dans les 20 centres hospitaliers français du réseau de surveillance Azay (12 concernant *M. marinum*) entre 2006 et 2008 (données adaptée (Maugein et Bauriaud 2009))

I.2.e / Les voies d'exposition

Les données françaises sur les formes de mycobactérioses (Figure 3B) sont totalement en accord avec les études d'autres pays pour lesquelles les formes pulmonaires, cutanées et ganglionnaires seraient causées ou soupçonnées d'avoir été causées par de l'eau contaminée (Annexe 3). Ces observations suggèrent aussi des formes respiratoires ou cutanées et soulignent l'existence de cas attribués à des actes iatrogènes comme les infections nosocomiales suite à un acte chirurgical (Rajini *et al.* 2007) ou les infections post-traumatiques (Adékambi *et al.* 2006e). Ces mycobactérioses acquises par voies respiratoire, cutanée ou iatrogène seraient principalement causées par de l'eau contaminée de différentes natures, allant de l'eau du robinet à l'eau de rivière en passant par l'eau de baignade, des aérosols ou de l'eau marécageuse (Annexe 3). Par ailleurs, une seule étude, en Floride, indique que le sol serait un réservoir du MAC associé à des infections humaines, et que les personnes ayant des expositions prolongées au sol auraient un risque accru d'infection par le MAC (Reed *et al.* 2006). Néanmoins, aucune étude à ce jour ne décrit la ou les voies d'exposition aux NTM provenant du sol.

- ***Voie d'exposition aux infections pulmonaires***

Parmi les infections humaines aux NTM 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 *M. szulgai* chez des adultes immunodéprimés (Zhang *et al.* 2002) ainsi que des infections par le MAC (Khour *et al.* 2001 ; Falkinham 2003b ; Lumb *et al.* 2004 ; Primm *et al.* 2004 ; Marras *et al.* 2005 ; Sood *et al.* 2007) et, dans une moindre mesure, des infections à *M. fortuitum* (Khour *et al.* 2001 ; Sood *et al.* 2007), *M. immunogenum* (Falkinham 2003b ; Kim et Yur 2004 ; Primm *et al.* 2004), et *M. terrae* (Jussila *et al.* 2002), *M. chelonae* (Primm *et al.* 2004) chez des adultes immunocompétents. Ces infections par inhalation ont été observées dans des jacuzzis (Kahana et Kay 1997 ; Khour *et al.* 2001), des enceintes de loisirs (Falkinham 2003b ; Lumb *et al.* 2004 ; Primm *et al.* 2004), des locaux infiltrés d'eau (Jussila *et al.* 2002), des locaux de travail (Falkinham 2003b) et même des enceintes hospitalières (Zhang *et al.* 2002) et des maisons individuelles (Falkinham 2003a ; Marras *et al.* 2005), au Canada, en Australie, en Finlande et aux USA. Certaines formes pulmonaires de mycobactérioses humaines ont aussi été décrites sans pour autant pouvoir les relier à des infections d'origines hydriques. Cela a été le cas aux USA, Corée, Israël, Afrique du Sud ou Canada, et les espèces incriminées étaient majoritairement *M. kansasii* (Corbett *et al.* 1999 ; Marras *et al.* 2004 ; Manali *et al.* 2005 ; Yim *et al.* 2005 ; Shitrit *et al.* 2006), ainsi que les espèces du MAC (Corbett *et al.* 1999 ; Eckburg *et al.* 2000), *M. gordonae* (Barber *et al.* 1991 ; Corbett *et al.* 1999 ; Eckburg *et al.* 2000), *M. mucogenicum* (Eckburg *et al.* 2000), *M. xenopi* (Park *et al.* 2007), *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* et *M. terrae* (Corbett *et al.* 1999).

- ***Voie d'exposition aux infections cutanées***

Les infections cutanées aux NTM 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 (Ross *et al.* 1997 ; Stinear *et al.* 2000 ; Pedley *et al.* 2004 ; Williamson *et al.* 2008), d'autres NTM causent dans l'hémisphère nord des infections cutanées. L'eau de l'environnement a été incriminée dans des cas de dermatites ulcératives causées par *M. bohemicum* chez des personnes âgées en Finlande (Torkko *et al.* 2001). Aux USA, de nombreuses études rapportent des cas d'infections cutanées ou des furonculoses chez des personnes immunocompétentes, provoquées par des NTM ayant contaminé l'eau de centres de pédicure comme *M. fortuitum* (Winthrop *et al.* 2002 ; Sniezek *et al.* 2003 ; Vugia *et al.* 2005), *M. chelonae* (Sniezek *et al.* 2003) et *M. mageritense* (Gira *et al.* 2004). Des infections cutanées des membres, sous forme de nodules, ont aussi été observées chez des personnes immunocompétentes ayant contracté *M. marinum* après un contact cutané avec de l'eau

contaminée de piscines en Chine (Cai *et al.* 2006) ou d'aquariums aux USA (Cassetty et Sanchez 2004). Sans pour autant relier l'infection à une contamination hydrique, l'espèce *M. cosmeticum* a été décrite dans le cas d'une femme présentant des lésions sous-dermales suite à des bains de pieds et d'éviers dans un centre de mésothérapie aux USA (Cooksey *et al.* 2004).

- **Voie d'exposition aux infections ganglionnaires**

L'eau en général est une origine possible des infections ganglionnaires chez les enfants aussi nommées lymphadénites et pouvant être dues aux espèces du MAC, *M. kansasii*, et *M. scrofulaceum* (Falkinham 2003a ; Primm *et al.* 2004). Plus précisément, des infections ganglionnaires aux NTM ont pu être causées par de l'eau de piscine contaminée par les espèces du MAC ou *M. haemophilum* aux Pays-Bas (Lindeboom *et al.* 2005), et de l'eau du robinet contaminée par *M. gordonae* en Suisse et en Italie (Tortoli *et al.* 1999), respectivement chez des enfants et des sujets immunodéficients. Sans incriminer l'eau comme vecteur de l'infection, des lymphadénites méningées ont de plus été provoquées par *M. mucogenicum* en France chez des personnes immunocompétentes (Adékambi *et al.* 2006b) et par *M. palustre* chez des enfants en Finlande (Torkko *et al.* 2002).

- **Voie d'exposition aux infections articulaires et osseuses**

Sans vecteur de contamination connu, des infections articulaires et osseuses sont à noter. Ces infections peuvent prendre plusieurs formes comme des ostéomyélites (infection de l'os) au Japon (Yano *et al.* 2004) et des arthrites septiques (inflammation de l'articulation) en Israël (Neuberger *et al.* 2006) provoquées par *M. kansasii*, des ténosynovites (inflammation d'un tendon et de sa gaine synoviale) en Chine provoquées par *M. marinum* (Tsai *et al.* 2006), des spondylites (inflammation des vertèbres) en France provoquées par *M. xenopi* (Meybeck *et al.* 2005). D'après une étude en France, l'eau du robinet d'un bloc chirurgical fut la source de contamination à *M. xenopi* au cours d'interventions chirurgicales sur des patients souffrants d'hernies discales. Les infections des vertèbres en résultant furent observées jusqu'à 4 ans après les mesures de contrôle mises en place (Astagneau *et al.* 2001).

- **Voie d'exposition aux infections particulières**

Certaines infections aux NTM liées à l'eau surviennent en raison d'autres facteurs additionnels. Par exemple, les personnes à risques comme les patients porteurs du virus de l'immunodéficience humaine (human immunodeficiency virus: HIV) sont particulièrement sensibles aux infections d'origine hydrique causées par le MAC (Falkinham 2003b). Les actes chirurgicaux, comme les laparoscopies, sont aussi des facteurs augmentant le risque d'infection à *M. chelonae* liée à l'eau (Rajini *et al.* 2007). Il a été aussi décrit un cas d'infection à *M. conceptionense* chez une personne ayant séjourné longtemps dans l'eau d'une rivière suite à une lésion ouverte accidentelle du tibia (Adékambi *et al.* 2006e). L'eau de rivière semble aussi pouvoir véhiculer MAP (Pickup *et al.* 2005), soupçonnée être l'agent étiologique de la maladie de Crohn (Legrand *et al.* 1999). 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 MAP. A ce jour, l'état des recherches rend difficile d'affirmer que l'agent responsable de la maladie de Crohn est MAP, ou une nouvelle espèce de mycobactérie, ou encore une cause multifactorielle (Thorel 1989). Sans relier ces cas à une contamination d'origine hydrique, des formes très particulières de mycobactérioses sont observables comme des néphrites (inflammation du rein) en Italie (Serra *et al.* 2007) et des nécroses des tissus en Finlande (Lehtinen *et al.* 2005) provoquées par *M. fortuitum*, ainsi que d'autres infections diverses en Zambie provoquées par *M. lentiflavum* et *M. intracellulare* (Buijtsels et Petit 2005).

I.2.f / Les facteurs de virulence

- ***Les familles de protéines PE et PPE***

Une importante proportion des capacités codantes des mycobactéries est utilisée pour produire deux familles de protéines mycobactériennes de surface énigmatiques qui ont la particularité d'être riches en glycine : la famille PE et la famille PPE. Comme leur nom l'indique, ces familles de protéines présentent toutes en N terminal les profils Pro-Glu (PE) et Pro-Pro-Glu (PPE), suivis de résidus conservés de taille variable, et de répétitions de motifs riches en glycine en position C terminal (Cole *et al.* 1998 ; Garnier *et al.* 2003 ; Li *et al.* 2005 ; Stinear *et al.* 2010). A titre d'exemple, ces familles de protéines représenteraient 4,2 % des protéines de *M. tuberculosis* (167 PE et PPE), 1,4 % pour *M. bovis* (57 PE et PPE), 0,9 % pour *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (42 PE et PPE), 2,8 % pour *M. ulcerans* (115 PE et PPE) et 5,2 % pour *M. marinum* (281 PE et PPE). Sans pour autant avoir défini clairement leur rôle, ces familles de protéines PE et PPE joueraient un rôle antigénique majeur dans les mécanismes de réponse immunitaire (Denis et Perronne 2004). De plus, une étude de comparaison des génomes a souligné que la différence principale entre ceux de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* et MAP, était les gènes codant la synthèse de ces protéines riches en glycine (Marri *et al.* 2006).

- ***Les protéines ESAT***

Les gènes codant les familles de protéines PE et PPE seraient associés avec une protéine de 6 kDa (early secretory antigenic target: ESAT-6) qui encode un système de sécrétion antigénique dépendant de l'adénosine triphosphate (adénosine-5'-triphosphate: ATP) (Ripoll *et al.* 2009). Ces protéines ESAT-6 sont codées par groupe de gènes nommés *esx* (early secretory system), en particulier le gène *esx-3 a*, à ce jour, été trouvé chez toutes les mycobactéries dont le génome a été totalement séquencé, et jouerait donc un rôle fondamental dans le cycle de vie des mycobactéries, ainsi que le gène *esx-1*, nécessaire à la propagation dans les macrophages et à la formation de granulomes, deux clefs essentielles de la pathogénicité des mycobactéries (Stinear *et al.* 2010).

- ***Les protéines MCE***

Les protéines d'entrée dans les cellules de mammifère (mammalian cell entry : MCE), permettant aux mycobactéries d'envahir les cellules hôtes en résistant dans les macrophages, sont codées par un opéron *mce* dont le nombre serait lié à la pathogénicité des actinomycètes. Par exemple, il est possible de dénombrer chez *M. abscessus*, *Nocardia farcinica* et *M. smegmatis*, respectivement 7, 6 et 4 opérons *mce*, alors qu'il n'y en aurait seulement un chez les actinomycètes non pathogènes *Streptomyces avermitilis* et *Streptomyces coelicolor* (Ripoll *et al.* 2009). Respectivement 4 et 8 gènes *mce* ont été dénombrés chez *M. tuberculosis* et *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ; ce gène a aussi été identifié chez *M. bovis*, *M. smegmatis* et *M. avium* (Li *et al.* 2005).

- ***Les protéines LpqH***

Les lipoprotéines de 19 kDa précurseurs d'antigènes (lipoprotein antigen precursor: LpqH) sont les antigènes immunitaires mycobactériens majoritairement reconnus par les lymphocytes T. Les LpqH joueraient un rôle dans la modification de la réponse de l'hôte. Les protéines LpqH sont détectables dans le sérum de patients tuberculeux et sont encodées sous des formes similaires ou non, par exemple, dans les génomes des NTM *M. abscessus* (Ripoll *et al.* 2009), *M. marinum* (Stinear *et al.* 2010) et *M. bovis* (Garnier *et al.* 2003).

- ***Les régulateurs des facteurs de virulence***

Certaines NTM comme *M. smegmatis* et *M. abscessus* possèdent des régulateurs de contrôle de la virulence proches des facteurs sigma de *M. tuberculosis* (SigA, SigC, SigD, SigE, SigH: sigma factors). Plus précisément *M. smegmatis* et *M. abscessus* possèderaient

respectivement 4 et 5 de ces régulateurs et *M. abscessus* produirait en plus un facteur de transcription de la virulence homologue à celui de *M. tuberculosis* codé par *virS* (virulence factor) (Ripoll *et al.* 2009 ; Stinear *et al.* 2010). Par ailleurs le système de régulation dépendant au fer (iron-dependent regulatory function), codé par le gène *ideR*, jouerait un rôle majeur dans la régulation de la virulence des mycobactéries. Effectivement, en présence d'une concentration intracellulaire importante en fer, causée par un environnement riche en fer, le système *ideR* augmenterait les défenses contre ce stress oxydant, activerait les gènes *bfrA* (bactéroferritin) et *bfrB* (ferritin) codant les protéines bactéroferritine et ferritine de stockage du fer, et réprimerait le gène *mbt* (mycobactin) codant la production de mycobactine (sidérophore), ce qui aurait un impact direct sur la virulence, car le système *ideR* contrôlerait aussi la production des protéines antigéniques PE et PPE (Marcela Rodriguez et Smith 2003).

• **Résistance aux antibiotiques**

La structure et l'architecture complexe et particulière de la paroi des mycobactéries suggère que cette dernière joue un rôle primordial dans leur virulence mais aussi dans leur résistance naturelle aux antibiotiques (Legrand *et al.* 1999). Plus précisément, les antibiotiques, comme la rifampicine, la clarithromycine, l'amikacine, la ciprofloxacine, la clofazimine, l'éthambutol, la rifabutine, la cyclosérine ou l'éthionamide, peuvent être utilisés dans le traitement des infections causées par le MAC (Inderlied *et al.* 1993), qui peut présenter des résistances à la clarithromycine et à la rifampicine (Cangelosi *et al.* 2001). Néanmoins peu de données récentes existent concernant la résistance aux antibiotiques des NTM, notamment pour ceux classiquement utilisés pour ces types d'infections bactériennes (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques résistante (R), intermédiaire (I) et sensible (S) des antibiotiques classiquement utilisés pour traiter les infections *M. avium*-intracellulaire, vis-à-vis d'autres espèces de mycobactéries non-tuberculeuses (Tortoli 2006)

Espèce	Antibiotiques					
	AK	CIP	CLM	EB	RIF	STR
<i>M. arupense</i>	V	R	S	S	R	R
<i>M. caprae</i>	S	S	-	S	S	S
<i>M. chimaera</i>	V	V	V	R	V	V
<i>M. florentinum</i>	V	R	S	V	V	-
<i>M. parascrofulaceum</i>	V	R	S	R	S	V
<i>M. parmense</i>	-	S	S	S	S	S
<i>M. pinnipedii</i>	-	-	-	S	S	S
<i>M. pseudoshottsii</i>	-	-	-	S	S	-
<i>M. saskatchewanense</i>	S	S	S	I	S	S
« <i>M. sherrisii</i> »	-	R	S	R	R	-

AK : amikacine, CIP : ciprofloxacine, CLM : clarithromycine, EB : éthambutol, RIF : rifampicine : ST : streptomycine.

I.2.g / Le mécanisme de virulence

Le mécanisme de virulence des espèces du MAC, qui fait office de modèle pour les NTM, n'est que partiellement décrit. Les macrophages humains auraient la faculté de phagocyter *M. avium* ssp., autre que *paratuberculosis*, via le composant C3 du complément, qui fixerait une hémagglutinine liant l'héparine (heparin-binding hemagglutinin : HbhA) de la membrane du bacille et qui activerait la phagocytose (Mueller-Ortiz *et al.* 2001). Le récepteur à fibronectine serait aussi responsable de l'intégration des bacilles aux macrophages, en relation avec l'activité d'un anion super-oxyde sécrété par la cellule phagocytaire (Inderlied *et al.* 1993). D'autre part, une expérimentation par inoculation artificielle de macrophage de moelle osseuse de souris a démontré que les espèces du MAC ont la capacité de résister aux attaques de macrophages et de se multiplier dans ces phagosomes du fait d'une altération physiologique de ces derniers (Schaible *et al.* 1998). De plus, d'autres observations indiquent que des souches du MAC ont la capacité d'inhiber partiellement les fusions entre les

phagosomes et les lysosomes, ce qui freine la lyse des mycobactéries par les enzymes de protéolyse des lysosomes de l'hôte (Frehel *et al.* 1986 ; Inderlied *et al.* 1993).

I.3 / L'écologie

Rares sont les études ayant proposé une estimation de la quantité de NTM dans les environnements terrestres et aquatiques, qu'ils soient naturels ou non (Tableau 5). Néanmoins, la prévalence des NTM dans ces environnements, ainsi que certaines études plus spécifiques, permettent de décrire certaines facettes de l'écologie des NTM.

Tableau 5 : Rares cas d'étude de quantification non normalisée des mycobactéries non-tuberculeuses dans des milieux aquatiques et terrestres

Espèce	Type d'eau	Pays	UFC/l	Référence
<i>M. xenopi</i>	réseau d'eau potable	France	1,0.10 ¹ -1,0.10 ²	(Dailloux <i>et al.</i> 2003)
<i>M. paratuberculosis</i>	rivière	UK	1,0.10 ³ -1,0.10 ⁸	(Pickup <i>et al.</i> 2005)
<i>M. avium</i>	Spa	Australie	1,0.10 ³ -4,3.10 ⁷	(Lumb <i>et al.</i> 2004)
<i>Mycobacterium</i> spp.	ruisseau	Finlande	8,0.10 ² -2,2.10 ³	(Torkko <i>et al.</i> 2002)
<i>Mycobacterium</i> spp.	biofilm (eau potable)	Afrique du Sud	0,1.10 ¹ -4,6.10 ⁵	(September <i>et al.</i> 2004)
<i>Mycobacterium</i> spp.	réseau d'eau potable	USA	0,2.10 ¹ -1,0.10 ³	(Hilborn <i>et al.</i> 2006)
<i>Mycobacterium</i> spp.	réseau d'eau potable	Plusieurs	0,1.10 ¹ -3,5.10 ³	(Vaerewijck <i>et al.</i> 2005)
<i>Mycobacterium</i> spp.	milieu naturel	Finlande	9,7.10 ² -5,8.10 ³	(Torkko <i>et al.</i> 2001)
<i>Mycobacterium</i> spp.	réseau d'eau potable	Finlande	0,1.10 ¹ -1,0.10 ³	(Torvinen <i>et al.</i> 2004)
<i>Mycobacterium</i> spp.	souterraines et de réseaux	France	0,1.10 ¹ -5,0.10 ²	(Le Dantec <i>et al.</i> 2002b)
<i>Mycobacterium</i> spp.	ruisseau	Finlande	0,1.10 ¹ -2,2.10 ³	(Ivanainen <i>et al.</i> 1993)
<i>Mycobacterium</i> spp.	Sols	Finlande	1,0.10 ⁷ -1,0.10 ⁸	(Nieminen <i>et al.</i> 2006)
<i>Mycobacterium</i> spp.	sols humiques	Finlande	1,0.10 ⁵ -1,0.10 ⁶	(Nieminen <i>et al.</i> 2006)
<i>Mycobacterium</i> spp.	sols neutres	Malawi	2,0.10 ² -1,0.10 ⁴	(Chilima <i>et al.</i> 2006)

I.3.a / Les habitats terrestres

Même si les études sur la diversité des NTM dans les sols sont rares, elles soulignent l'importance de cette dernière (Tableau 6).

Tableau 6 : Rares études rapportant la présence d'espèces de mycobactéries non-tuberculeuses dans différents types de sols

Type de sol	NTM	Origine	Référence
Sols acides de forêts	12 espèces	Finlande	(Niva <i>et al.</i> 2006)
Sols acides de forêts et de marécages	<i>M. avium</i>	Plusieurs	(Kirschner <i>et al.</i> 1999)
Sols neutres	18 espèces	Malawi	(Chilima <i>et al.</i> 2006)
Sols d'élevages	7 espèces	USA (Texas)	(Norby <i>et al.</i> 2007)

Plus précisément, il est avéré que les NTM se multiplient dans les sols riches en acides humiques présentant un pH faible (Falkinham 2009). Les marécages et les sols de certaines forêts présentant des valeurs faibles de pH et de fortes teneurs en acides humiques, seraient ainsi propices à la présence des NTM comme les espèces *M. senegalense*, *M. porcinum*, *M. septicum*, *M. fortuitum*, *M. cookii*, *M. flavescens*, *M. farcinogenes*, *M. septicum*, *M. farcinogenes*, *M. manitobense*, *M. terrae* et *M. elephantis* (Niva *et al.* 2006). Effectivement, il a été démontré que la croissance de *M. avium* est stimulée par les acides humiques et fulviques en milieux pauvres en oxygène dissous (Kirschner *et al.* 1999). Quantitativement, une seule étude sur des sols en Finlande, proposant une méthode basée sur l'hybridation sandwich fluorescente (fluorescent sandwich hybridization: FSH), estime que certains de ces sols peuvent contenir jusqu'à 10⁷-10⁸ mycobactéries/g, ou 10 à 100 fois moins en utilisant les outils classiques de bactériologiques (Nieminen *et al.* 2006). Une autre étude focalisant sur les sols d'élevage bovins a indiqué que les cultures positives des espèces du MAC, du MtC, du MAIS, ainsi que des espèces *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. asiaticum* et *M. abscessus*, étaient significativement associées avec des valeurs de faibles du pH, des concentrations en calcium faibles, et des concentrations fortes en fer, zinc et manganèse (Norby *et al.* 2007). Durant une étude des sols au Nord du Malawi, des espèces du MFC furent isolées dans l'ensemble des échantillons de sols testés (Chilima *et al.* 2006), Cette

étude, réalisée sur des sols présentant des pH relativement neutres, a mesuré entre 10^2 et 10^4 mycobactéries/g de sol en utilisant la coloration de Ziehl-Neelsen (Chilima *et al.* 2006), qui par ailleurs peut aussi colorer d'autres AFB (chapitre I§I.1.a /). Bien que les NTM isolées des sols soient plus fréquemment des espèces à croissance rapide (Chilima *et al.* 2006), un centre expérimental en Angleterre a de plus démontré que le sol pouvait contenir différentes espèces de NTM à croissance rapide proches de *M. fortuitum* mais aussi d'autres à croissance lente proches de *M. lentiflavum* (Mendum *et al.* 2000).

Par ailleurs, les NTM comme *M. avium* peuvent survivre dans les sols (Legrand *et al.* 1999). Se focalisant sur la survie de MAP dans l'environnement, une étude rapporte effectivement, que cette sous-espèce du MAC peut survivre jusqu'à 55 semaines dans des sols de pâturage sec, totalement à l'obscurité, et dans une moindre mesure en présence de lumière (Whittington *et al.* 2004). Cette étude souligne aussi que l'ajout de moisissures ou de chaux au sol n'affectait pas la survie de MAP, qui comme d'autres mycobactéries, aurait la capacité de rentrer en dormance grâce à des éléments génétiques semblables aux gènes *dps* codant la synthèse du décaprényl diphosphate, et *relA* codant la guanosine 3',5'-bispyrophosphate (Whittington *et al.* 2004). Le gène *dps* conférerait une résistance au stress oxydant comme celui du peroxyde d'oxygène, rencontrée chez les microorganismes pathogènes intracellulaires ou les microorganismes symbiotiques (Park *et al.* 2006), et le gène *relA* jouerait un rôle majeur dans la régulation des traits phénotypiques qui sont requis pour l'expression de la virulence et de la persistance des bactéries pathogènes (Nascimento *et al.* 2008). D'autres mécanismes de résistance aux moisissures peuvent aussi être observés, comme par exemple pour la NTM *M. fluoranthenorans* qui a la possibilité de dégrader l'aflatoxine B₁ pour se prémunir des attaques des *Aspergillus flavus* pouvant être présents dans les sols (Hormisch *et al.* 2004).

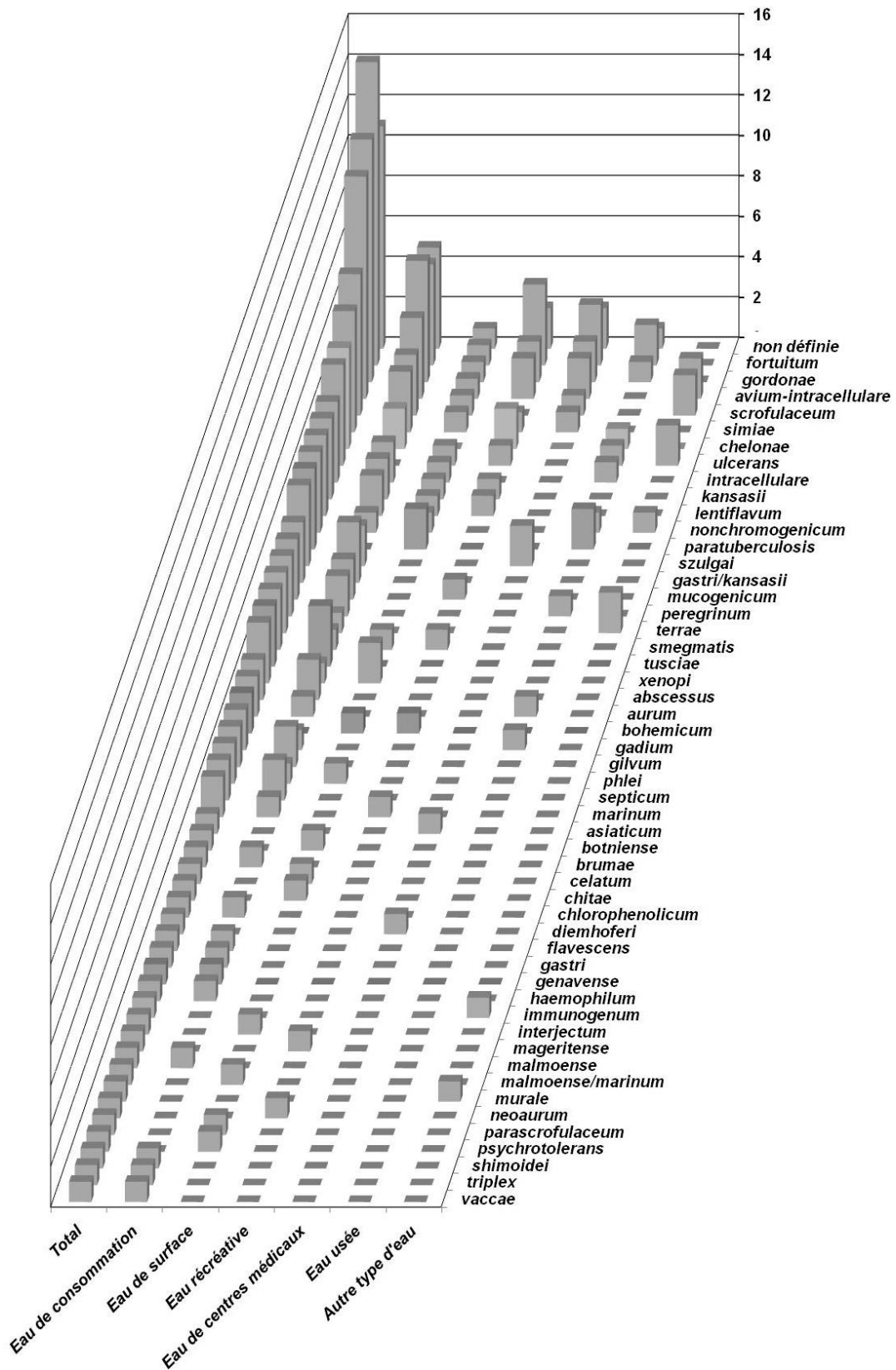
I.3.b / Les habitats aquatiques

La diversité des espèces de NTM dans les habitats aquatiques a été beaucoup plus décrite que celle des habitats terrestres. Tout comme celle des habitats terrestres, la diversité des NTM est très importante dans les habitats aquatiques naturels, mais aussi dans les environnements aquatiques non naturels comme les canalisations d'eau potable, les réseaux d'eau usée, les effluents hospitaliers, ou les bases de loisirs aquatiques (Tableau 7).

Tableau 7 : Etudes rapportant la présence d'espèces de mycobactéries non-tuberculeuses dans de l'eau de surface (A), de l'eau de consommation (B), des eaux usées (C), de l'eau de centre médicaux (D), de l'eau récréative (E), et d'autre type d'eau (F)

Type d'eau	NTM	Origine	Référence
A Rivière	<i>M. paratuberculosis</i>	UK (south wale)	(Pickup <i>et al.</i> 2005)
Rivière	<i>M. paratuberculosis</i>	UK (south wale)	(Pickup <i>et al.</i> 2006)
eau de l'environnement	plusieurs espèces	Malawi (Karonga)	(Chilima <i>et al.</i> 2006)
rivière d'eau douce	15 espèces	Nouveau Mexique (Rio Grande)	(Bland <i>et al.</i> 2005)
Etang	<i>M. psychrotolerans</i>	Espagne	(Trujillo <i>et al.</i> 2004)
lac peu profond	<i>M. ulcerans</i>	Australie (Langwarrin)	(Stinear <i>et al.</i> 2000)
bassin d'un parc	<i>M. parascrofulaceum</i>	USA (Norris Geysers)	(Santos <i>et al.</i> 2007)
eau de l'environnement	<i>M. bohemicum</i>	Finlande (western coast)	(Torkko <i>et al.</i> 2001)
eau de l'environnement	2 espèces	Plusieurs	(Primm <i>et al.</i> 2004)
B système de distribution	3 espèces	USA (western)	(Hilborn <i>et al.</i> 2006)
système de distribution	34 espèces	Plusieurs	(Vaerewijck <i>et al.</i> 2005)
eau du robinet	<i>M. tusciae</i>	Italie	(Tortoli <i>et al.</i> 1999)
eau potable et glace	10 espèces	USA	(Covert <i>et al.</i> 1999)
système de distribution	4 espèces	Finlande	(Torvinen <i>et al.</i> 2004)
biofilm de tuyauterie	4 espèces	Afrique du Sud (semiurban)	(September <i>et al.</i> 2004)
eau du robinet	6 espèces	Chine (Yuan)	(Chang <i>et al.</i> 2002)
eau potable	2 espèces	Plusieurs	(Primm <i>et al.</i> 2004)
eau souterraine	8 espèces	France (Paris)	(Le Dantec <i>et al.</i> 2002b)
C station d'épuration	<i>M. fortuitum</i>	Plusieurs	(Primm <i>et al.</i> 2004)
eaux usées d'élevage	<i>M. paratuberculosis</i>	USA (Californie)	(Lagunas-Solar <i>et al.</i> 2005)
eau non traitée	<i>M. paratuberculosis</i>	Irlande du Nord	(Whan <i>et al.</i> 2005)
D Hôpital	2 espèces	USA (Houston)	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
eau d'hémodialyse	plusieurs espèces	Espagne (Mallorca)	(Gomila <i>et al.</i> 2007)
Dentiste	plusieurs espèces	Angleterre (S-W)	(Walker <i>et al.</i> 2000)
bain de thérapie	5 espèces	USA (midwestern)	(Angenent <i>et al.</i> 2005)
Hôpital	6 espèces	Plusieurs	(Primm <i>et al.</i> 2004)
E eau de bain de pied	9 espèces	USA (Californie)	(Vugia <i>et al.</i> 2005)
eau de bain de pied	2 espèces	USA (Californie)	(Sniezek <i>et al.</i> 2003)
Jacuzzi	<i>M. bohemicum</i>	Canada (Ontario)	(Kahana <i>et al.</i> 1997)
eau de bain de pied	<i>M. fortuitum</i>	USA (Californie)	(Winthrop <i>et al.</i> 2002)
bain public	7 espèces	Plusieurs	(Primm <i>et al.</i> 2004)
bain d'un spa	<i>M. avium/intracellulare</i>	Australie	(Lumb <i>et al.</i> 2004)
F fluide en métallurgie	<i>M. immunogenum</i>	USA et Canada	(Wallace <i>et al.</i> 2002)
système d'irrigation	<i>M. ulcerans</i>	Australie (Phillip Island)	(Stinear <i>et al.</i> 2000)
eau résidentielle	3 espèces	Plusieurs	(Primm <i>et al.</i> 2004)
eau de baignoire	<i>M. avium/intracellulare</i>	Canada (Toronto)	(Marras <i>et al.</i> 2005)
système d'irrigation	4 espèces	Australie (Phillip Island)	(Ross <i>et al.</i> 1997)
immeuble infiltré d'eau	<i>M. murale</i>	Finlande (Helsinki)	(Vuorio <i>et al.</i> 1999)

Dans cette littérature sur l'occurrence des espèces de NTM dans les différents types d'eau (Tableau 7), les espèces de NTM *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. chelonae*, *M. ulcerans*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. nonchromogenicum*, *M. avium ssp paratuberculosis* et *M. szulgai*, sont les plus citées (Figure 4). Il est à noter qu'une grande partie des espèces de NTM n'ont pas pu être identifiées à l'époque de leur isolement. De fait, l'occurrence des espèces est biaisée par l'époque, le lieu d'isolement, les différentes méthodes d'isolement utilisées aux cours du temps, ainsi que par l'intérêt, que portait la recherche, sur l'étude des espèces de NTM responsables majoritairement des pathologies humaines et animales (Figure 4). Néanmoins, ces données d'occurrence et de diversité indiquent que l'eau de consommation, à savoir l'eau du robinet, l'eau des réseaux de distribution d'eau potable, ainsi que l'eau des filières de potabilisation, est un type d'eau majoritairement cité dans la littérature sur les NTM d'origine hydrique en comparaison aux autres types d'eau (Figure 4). Ceci est certainement dû au fait que l'eau de consommation est une matrice largement étudiée dans un souci de santé publique, en comparaison à l'eau de l'environnement naturel.



(Kahana et Kay 1997 ; Kahana *et al.* 1997 ; Ross *et al.* 1997 ; Tortoli *et al.* 1999 ; Vuorio *et al.* 1999 ; Stinear *et al.* 2000 ; Walker *et al.* 2000 ; Torkko *et al.* 2001 ; Chang *et al.* 2002 ; Le Dantec *et al.* 2002b ; Le Dantec *et al.* 2002a ; Wallace *et al.* 2002 ; Winthrop *et al.* 2002 ; Zhang *et al.* 2002 ; Sniezek *et al.* 2003 ; Lumb *et al.* 2004 ; Primm *et al.* 2004 ; September *et al.* 2004 ; Trujillo *et al.* 2004 ; Angenent *et al.* 2005 ; Bland *et al.* 2005 ; Lagunas-Solar *et al.* 2005 ; Marras *et al.* 2005 ; Pickup *et al.* 2005 ; Vaerewijck *et al.* 2005 ; Vugia *et al.* 2005 ; Whan *et al.* 2005 ; Chilima *et al.* 2006 ; Hilborn *et al.* 2006 ; Pickup *et al.* 2006 ; Gomila *et al.* 2007 ; Santos *et al.* 2007).

Figure 4 : Proportion (%) de citations d'espèces de mycobactéries non-tuberculeuses dans la littérature rapportant leur occurrence dans différents échantillons d'eau (156 citations d'espèces dans 32 articles publiés entre 1997 et 2007)

- **Les habitats aquatiques naturels**

Tout comme les habitats terrestres naturels, il a été démontré que les NTM peuvent se multiplier dans l'eau proche d'environnements à pH faible (Falkinham 2009). Effectivement dans l'eau de rivière d'un bassin versant finlandais, la présence de NTM a été corrélée à des valeurs faibles de pH alors que cela n'a pas été le cas pour d'autres bactéries hétérotrophes (Iivanainen *et al.* 1993). Par ailleurs, dans cette étude un modèle expliquant 83 % des variations a été proposé, et justifie la présence des NTM dans cette rivière par des valeurs faibles de pH (5,6-5,9), la présence de plaines de tourbe et de zones de drainage à proximité, ainsi que par une demande chimique en oxygène (DCO) élevée ($80 \pm 140 \text{ mgO}_2/\text{l}$) et une concentration forte en potassium (Iivanainen *et al.* 1993). Cette étude a également observé une corrélation positive entre le dénombrement des NTM par bactériologie et les concentrations de Fe, Al, Cu, Co et Cr dans l'eau de surface (Iivanainen *et al.* 1993). Effectivement, les NTM se sont adaptées aux conditions salines des eaux douces puisqu'elles peuvent résister jusqu'à 3 g/l de NaCl (Dailloux *et al.* 1999), et sont majoritairement mésophiles, à l'exception de *M. psychrotolerans* qui peut se multiplier à des températures basses (Derz *et al.* 2004), ce qui leur permet de se multiplier dans les eaux de rivière des régions tempérées. Par ailleurs, en raison du temps de génération long des mycobactéries dans l'environnement, 2,5 heures pour *M. smegmatis* et 7 heures pour *M. marinum*, par exemple, dans des conditions favorables en laboratoire (Bartmann 1975), ces dernières ne peuvent pas en théorie coloniser efficacement les environnements aquatiques naturels, car elles sont en compétition avec des espèces aux temps de génération plus rapides comme beaucoup de Protéobactéries (Kazda 2000). Toutefois il est à noter que dans l'environnement la plupart des espèces bactériennes ont des temps de génération longs allant de 20 à 200 heures et que les bactéries copiotrophes (vivant dans des environnements riches en nutriments, en particulier riches en carbone) à temps de génération courts sont le plus souvent sous forme dormante attendant un apport en matière organique (Roszak et Colwell 1987). La nature hydrophobe des NTM et leur résistance aux UV, confère sans doute à ces dernières la capacité d'occuper des micro-environnements spécifiques, par exemple les interfaces air-eau riches en lipides et exposées aux UV comme le neuston (ensemble des organismes liés à la surface de l'eau), ou bien les interfaces eau-surfaces (particules, plantes, pierres) ou la matière organique hydrophobe va également s'adsorber. Leur résistance aux acides leur confère aussi un avantage sélectif. Effectivement, ne rencontrant que peu de compétition dans les environnements acides auxquels elles résistent, les NTM semblent se multiplier d'avantage dans ces conditions que dans un environnement présentant des pH neutres, plus propices à la multiplication de microorganismes neutrophiles. Ainsi, les NTM semblent donc se multiplier préférentiellement dans l'eau de surface riche en acides humiques.

- **Les filières de potabilisation**

Les espèces de NTM *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. aurum*, *M. gadium*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* et *M. intracellulare* qu'elles proviennent d'eaux souterraines ou d'eaux de surface peuvent être présentes dans les stations de potabilisation, coloniser les granulés de charbon actif de ces stations, et ensuite être éliminées par un traitement final par chloration, comme cela a été rapporté pour la ville de Paris (Le Dantec *et al.* 2002b). Ainsi des stations de potabilisation utilisant des granulés de charbon actif, où peuvent se multiplier des NTM, et présentant une étape de chloration inefficace, peuvent apporter certaines espèces de NTM dans le réseau de distribution d'eau potable. Effectivement, l'étude de l'efficacité du traitement au chlore des usines de potabilisation (coefficient de létalité k exprimé en L/min/mg), montre que les espèces *M. fortuitum* ($k = 0,02$) et *M. chelonae* ($k = 0,03$) sont plus résistantes que les espèces *M. gordonae* ($k = 0,09$) et *M. aurum* ($k = 0,19$), qui quant à elles sont 100 à 330 plus résistantes que *E. coli* (Le Dantec *et al.* 2002a). De plus, il a été démontré que la résistance au chlore de *M. avium* et *M. intracellulare* est significativement plus importante lorsque la bactérie s'est multipliée en

biofilm sur du polystyrène ou du verre, qu'en suspension (Steed et Falkinham 2006). Au sujet de la résistance au chlore, il est à noter que la désinfection par utilisation de chloramines (produits de chloration en présence de matières organiques) est plus efficace sur *M. avium* que la chloration (chlore libre) en raison des interactions corrosives avec les canalisations en métal (Norton *et al.* 2004).

- **Les réseaux de distribution d'eau potable**

Concernant les espèces de NTM qui arrivent dans le réseau de distribution d'eau, la croissance de ces dernières sous forme de biofilm serait favorisée par la présence de matière organique (Falkinham *et al.* 2001), ainsi que la faible présence de compétiteurs qui ne résistent pas aux traitements de potabilisation de l'eau (Kazda et Pavlik 2009). En effet, une étude pilote a démontré que la désinfection des canalisations éliminait les bactéries hétérotrophes, mais conduisait à une sélection quasiment à 100 % de *M. avium* (Norton *et al.* 2004). En outre, dans l'eau d'usines de potabilisation aux USA, *M. avium* et *M. intracellulare* ont été retrouvées en entrée et en sortie d'usines, ainsi qu'en plus forte concentration dans le réseau de distribution (Falkinham *et al.* 2001). Dans cette étude, la turbidité et la concentration en matière organique de l'eau ont été corrélées à la quantité de ces deux NTM. Ceci démontre que ces dernières se multiplient dans le réseau de distribution d'autant plus facilement qu'il est riche en matière organique (Falkinham *et al.* 2001). Effectivement, les mycobactéries sont les plus hydrophobes des bactéries en raison de la composition lipidique importante de leur paroi, ce qui les conduit à s'adsorber facilement à la surface des bulles d'air dans l'eau, à la surface des bulles d'eau dans l'air, ou bien à la surface d'un plan d'eau (George et Falkinham 1989 ; Falkinham *et al.* 2004). La forte hydrophobicité des mycobactéries les conduit donc à se concentrer à l'interface eau/air, où la matière organique se concentre aussi par le même phénomène d'adsorption préférentielle (Falkinham 2004), entraînant la formation de biofilms mycobactériens sur la surface interne des conduits d'eau potable. De plus, une forte corrélation a été démontrée entre la résistance de *M. avium* et *M. intracellulare* au chlore et l'hydrophobicité des biofilms (Steed et Falkinham 2006), suggérant que la résistance au chlore des NTM est en partie causée par la formation des biofilms dans les canalisations d'eau potable. Plus récemment, une étude a démontré que l'espèce *M. marinum* produisait pendant la phase stationnaire de croissance une pseudocapsule constituée d'une alanine déshydrogénase de 40 kDa, lui permettant de se fixer à une surface hydrophobe comme le polystyrène, et d'initier à l'interface surface/air la formation d'un biofilm persistant en condition aérobie (Alavi *et al.* 2007).

I.3.c / Les interactions

L'association des NTM avec d'autres organismes ne semble pas être de type amensal (quand une espèce inhibe le développement de l'autre), mais plutôt de type commensal (le commensal bénéficie de son hôte sans lui nuire), ou parasitaire (le parasite se nourrit de la substance même de son hôte en le détruisant). Concernant le mutualiste (les deux organismes sont physiologiquement indépendants mais tirent un bénéfice mutuel à coopérer), il n'existe actuellement aucune indication de bénéfice pour une espèce animale, végétale ou protiste d'un bénéfice quelconque à coopérer avec une espèce mycobactérienne. Plus précisément, en fonction de l'espèce de NTM, l'association avec les insectes, d'autres microorganismes ou les végétaux semblent de type commensal, alors que l'association avec les amphibiens, les reptiles, les mammifères terrestres et les poissons semble parasitaire ou de type commensal.

- **L'association de type commensal**

Les associations connues entre les NTM, les protozoaires, les végétaux ou les invertébrés semblent plutôt de type commensal. La bactérie, tirant bénéfice de son hôte sous forme de source de matière organique ou de facteurs de croissance, pourrait aussi l'utiliser comme un abri contre des conditions adverses. Il est possible que dans certains cas cette association soit de type mutualiste, l'hôte tirant un avantage de la présence de la NTM. Par exemple la bactérie pourrait jouer un rôle d'apport en nutriments, vitamines, facteurs de croissance ou en acides gras essentiels, ou encore empêcher d'autres microorganismes d'envahir l'hôte, ou bien dégrader des déchets toxiques du métabolisme de l'hôte. Cependant jusqu'à présent ce type de bénéfice n'a pas encore été décrit, il est donc difficile de statuer sur la possibilité de relations mutualistes avec les NTM.

- *Avec les protozoaires*

Le protozoaire aquatique du genre *Acanthamoeba* semblerait être un hôte environnemental des NTM (Cirillo *et al.* 1997 ; Steinert *et al.* 1998 ; Miltner et Bermudez 2000 ; Adékambi *et al.* 2006d). Effectivement, il a été démontré *in vitro* qu'une souche de référence *M. avium* avait la capacité d'entrer dans le protozoaire aquatique *Acanthamoeba castellanii* et de s'y multiplier (Cirillo *et al.* 1997 ; Miltner et Bermudez 2000). D'autre part, il a été démontré *in vitro* que 26 espèces différentes de NTM avaient la capacité d'entrer dans les trophozoïtes et les kystes du protozoaire aquatique *A. polyphaga*, et d'y survivre 15 jours voir 24 h en présence de 15 mg/l de chlore libre (Adékambi *et al.* 2006d). Plus précisément, contrairement à *Legionella pneumophila* qui peut se multiplier en co-culture dans le kyste du protozoaire *A. polyphaga*, *M. avium* survivrait à l'extérieur de la double membrane du kyste et utiliserait les nutriments excrétés par ce dernier pour se multiplier de façon saprophyte (Steinert *et al.* 1998). Des études plus récentes proposent un modèle dans lequel les NTM résisteraient aux sécrétions de toxines de ces protistes unicellulaires, se répliqueraient à l'intérieur du protozoaire et éviteraient les sécrétions du lysosome. Cette résistance intracellulaire des mycobactéries leur permettrait aussi de se protéger contre les conditions défavorables de leur environnement lorsque l'amibe est sous forme de kyste (Salah 2009). Concernant les réseaux de distribution d'eau potable, une étude sur l'eau du robinet aux USA indique que les *Legionella* et les *Mycobacterium* sont détectées au printemps avec l'amibe *Acanthamoeba*, et en automne avec les amibes *Vahlkampfia* et *Naegleria* (Marciano-Cabral *et al.* 2010), suggérant que l'association de ces bactéries pathogènes avec ces amibes est régie par les saisons. Par ailleurs, cette capacité des NTM à survivre dans les amibes, leur conférerait un pouvoir pathogène chez l'homme. Effectivement, la multiplication dans les amibes favorisait l'entrée et la multiplication de la mycobactérie dans les macrophages humains (Cirillo *et al.* 1997 ; Miltner et Bermudez 2000) et les cellules épithéliales intestinales humaines (Miltner et Bermudez 2000). De plus, la présence de *M. avium* dans *A. castellanii* permettrait à la bactérie de résister à des traitements par antibiotiques comme la rifabutine, l'azithromycine et la clarithromycine habituellement utilisés pour traiter les mycobactérioses (Miltner et Bermudez 2000).

- *Avec les légumes et les végétaux aquatiques*

Indirectement liés au sol, il a été démontré que des légumes entrant dans la consommation humaine, comme les brocolis, les salades, les poireaux, le basilic, les champignons ou les pousses de Daikon, pouvaient être contaminés par des NTM (Yoder *et al.* 1999). Effectivement, en Californie, les espèces *M. avium*, *M. gordonae*, *M. genavense* ou *M. flavescens*, ont pu être isolées dans ces végétaux (Yoder *et al.* 1999). D'ailleurs, les zones à climat tempéré de la Floride semblent être particulièrement à risque vis-à-vis des mycobactérioses à *M. avium*, car le sol ne gèle pas en hiver, et les périodes de production agricole y sont plus longues (Reed *et al.* 2006). De plus, sans pour autant décrire de mécanismes de symbiose ou de parasitisme, l'étude sur la persistance et l'état de dormance de

MAP dans l'environnement, indique, en conditions expérimentales contrôlées, que cette sous-espèce du MAC peut survivre en présence de fèces dans l'herbe de pâturages jusqu'à 9 semaines sous 70 % d'obscurité, et jusqu'à 24 semaines sous obscurité totale (Whittington *et al.* 2004). Néanmoins, aucune interaction avec ce type de végétaux et les NTM n'a, à ce jour, été décrite. Par ailleurs, il serait possible de considérer les algues comme des réservoirs potentiels des NTM. En effet, que ce soit des algues de pays tropicaux comme *Rhizoclonium* ou des algues communes aux pays tropicaux et tempérés comme *Hydrodictyon*, ces dernières ont la faculté de stimuler la croissance de *M. ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli dans l'hémisphère sud (Marsollier *et al.* 2004b). Cette étude n'a pas démontré cette stimulation de croissance pour d'autres mycobactéries à croissance lente, mais cela ne signifie pas que d'autres algues de régions tempérées ne pourraient pas avoir le même effet sur les espèces de mycobactéries de l'hémisphère nord.

- *Avec les insectes aquatiques*

Certains insectes pourraient être des réservoirs de NTM. Effectivement, *M. ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli transmis par l'eau dans les pays de l'hémisphère sud (Ross *et al.* 1997 ; Stinear *et al.* 2000 ; Pedley *et al.* 2004 ; Williamson *et al.* 2008), semblerait atteindre l'humain via certains insectes aquatiques. Par exemple, la puce d'eau *Naucoris cimicoides*, serait un hôte de *M. ulcerans*, qui survivrait et se multiplierait dans ses glandes salivaires sans lui créer des dommages visibles (Marsollier *et al.* 2002 ; Marsollier *et al.* 2004a).

• *L'association parasitaire ou de type commensal*

L'association des NTM avec des vertébrés peut être soit parasitaire ou de type commensal en fonction de l'espèce de NTM considérée ou de l'état physiologique de la bactérie et de l'hôte. Les NTM sont des pathogènes opportunistes et donc peuvent être en association de type commensal avec un hôte sans provoquer de maladie. Lors d'une baisse des défenses de l'hôte cette relation commensale peut devenir parasitaire.

- *Avec les poissons*

Beaucoup d'espèces de poisson peuvent être des réservoirs de différentes espèces de NTM. *M. marinum* est la principale espèce d'une mycobactériose semblable à la tuberculose chez le poisson. Deux lignées de cette espèce sont responsables de pathologies, l'une uniquement chez les espèces poikilothermes (espèce dont la température corporelle varie avec celle du milieu), et l'autre à la fois chez ces espèces mais aussi chez les homéothermes (espèce dont la température corporelle est régulée par leur métabolisme) (van der Sar *et al.* 2004). Concernant les espèces poikilothermes, les poissons d'aquarium comme *Hypancistrus zebra* (van der Sar *et al.* 2004) ou d'aquaculture comme *Dicentrarchus labrax*, *Chaetodon fasciatus*, *Sparus aurata*, *Siganus rivulatus*, *Eretmochelys imbricata*, *Cyprinus carpio*, *Bidyanus bidyanus* et *Channa striata* peuvent être infectés par des NTM (Ucko et Colorni 2005). D'autre part, parmi les espèces de NTM décrites récemment une nouvelle a été isolée de bars d'Amérique présentant des ulcères cutanés et des lésions organiques dans la baie de Chesapeake dans le Maryland aux USA et nommée *M. chesapeaki* (Heckert *et al.* 2001). Concernant les poissons destinés à la consommation humaine, certains poissons congelés présentés en grande surface en Espagne (*Solea solea*, *Merluccius merluccius*, *Gadus morhua*, *Genypterus blacodes*, *Lophius piscatorius*) peuvent contenir des NTM dans leurs tissus et dans l'eau de décongélation, en particulier les espèces *M. terrae*, *M. peregrinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, et *M. chelonae* (Mediel *et al.* 2000). Néanmoins cette étude n'a pas pu déterminer si les NTM provenaient de l'eau ou du poisson, et aucune mycobactériose humaine d'origine alimentaire n'a, à ce jour, été démontrée. L'association des NTM avec les poissons serait donc parasitaire ou de type commensal en fonction de l'espèce de NTM considérée.

- Avec les amphibiens et les reptiles

Les NTM sont certainement les agents étiologiques majeurs des infections provoquant des granulomes chez les serpents, les tortues et les lézards (Soldati *et al.* 2004). La plus courante des infections à NTM chez les amphibiens et les reptiles, est l'infection à *M. marinum*, qui peut provoquer des épidémies en captivité chez la grenouille taureau *Pyxicephalus adspersus* et des serpents (Maslow et Wallace 2002), et se traduit par la colonisation des chairs de l'animal (Pizzi et Miller 2005). Par ailleurs des pathologies cardiovasculaires causées par les NTM sont aussi à noter chez les amphibiens (Heinz-Taheny 2009). Dans l'environnement, d'autres espèces de NTM comme *M. szulgai* (Chai *et al.* 2006) et *M. gordonae* (Kirsch *et al.* 2008) peuvent provoquer des granulomes viscéraux chez la grenouille *Xenopus tropicalis*, dont des lignées cellulaires confèrent à *M. ulcerans* la capacité de se multiplier *in vitro* à des températures basses de l'ordre de 28°C (Drancourt *et al.* 2002).

- Avec les oiseaux

Les oiseaux de différentes espèces sont des réservoirs potentiels de NTM. En effet, une étude menée par la Société Zoologique de San Diego aux USA sur les mycobactérioses des oiseaux de zoo, entre 1991 et 2005, a observé une prévalence et une incidence respectivement de 1,2 % et 3 ‰ pour différentes espèces d'oiseaux (Witte *et al.* 2008). Cette étude indique de plus que sur les quelques identifications d'espèces effectuées, *M. avium* fut la plus fréquemment détectée. D'autres résultats issus d'observations en Europe montrent que *M. genavense* semble être l'espèce fréquemment isolée chez les oiseaux entre 1986 et 1995 (Hoop *et al.* 1996), ainsi qu'entre 1983 et 1994 (Portaels *et al.* 1996). De même, il semble que dans une moindre mesure, les oiseaux puissent être infectés par les espèces *M. fortuitum*, *M. tuberculosis*, *M. gordonae*, et *M. nonchromogenicum* (Hoop *et al.* 1996).

- Avec les mammifères terrestres

Les mammifères terrestres sauvages et d'élevage semblent être des réservoirs majeurs des NTM. Par exemple, en France, la NTM *M. avium* peut infecter les animaux sauvages et les animaux d'élevage de la famille des bovidés, des suidés, des cervidés et des capridés (Biet *et al.* 2005). L'espèce *M. avium* cause d'ailleurs chez les porcs d'élevage des lésions tuberculeuses semblables à celles causées par des espèces du MTC, et pose donc des problèmes majeurs de prophylaxie de la tuberculose au cours de l'abattage des bêtes (Radomski *et al.* 2010) (Annexe 1). D'autres espèces de NTM peuvent aussi causer des infections chez les animaux sauvages et d'élevage. Par exemple en Egypte, les NTM *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. gallinarum* et *M. simiae* provoquent des infections dans les élevages de porcs (Mohamed *et al.* 2009). En République Tchèque, *M. avium* est aussi principalement responsable d'infections mycobactériennes chez les bovins, et les NTM *M. chelonae*, *M. terrae*, *M. phlei* et *M. fortuitum* peuvent aussi infecter ce bétail (Pavlik *et al.* 2002). Bien qu'il n'ait pas encore été prouvé que l'alimentation soit une voie de contamination, le lait cru de buffle d'eau utilisé pour fabriquer des fromages au Brésil peut contenir les NTM *M. simiae*, *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. gordonae* et *M. lentiflavum* et représenter un risque pour les consommateurs (Jordaö Junior *et al.* 2009). Les mammifères sauvages et d'élevages semblent donc des hôtes majeurs de certaines espèces parasites de NTM et pourraient les excréter dans leur lait ou les répandre dans l'environnement via leurs fèces, en particulier la sous-espèce MAP du MAC (Richards et Thoen 1977 ; Khare *et al.* 2004).

I.3.d / Le rôle écologique

Il n'existe que peu d'informations sur le rôle des NTM dans les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore. En comparaison aux génomes de *M. tuberculosis* et *M. bovis*, la perte dans celui de MAP de la fumarate réductase et de l'opéron uréase (*ure*), intégrant les gènes *ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureD*, *ureF* et *ureG*, indique qu'en condition anoxique, les nitrates sont une source d'énergie majeure pour cette sous-espèce du MAC, et que cette NTM présente probablement une faible préférence pour les environnements ammoniacés et azotés (Marri *et al.* 2006). Néanmoins, aucune donnée ne permet de généraliser cette voie préférentielle de dégradation des acides aminés aux autres NTM. Concernant le cycle du carbone, la littérature souligne néanmoins l'importance des NTM dans l'utilisation des composés hydrophobes, des acides humiques et des lipides.

- **Utilisation des xénobiotiques carbonés**

Concernant la dégradation du carbone, la littérature se focalise beaucoup sur la dégradation de xénobiotiques carbonés, en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (polycyclic aromatic hydrocarbons: PAH). Dans les bassins versants, les sols pollués en PAH, au même titre que les sols non pollués, présentent une grande diversité de NTM. Effectivement une étude indique que les sols pollués en PAH (pH de 5,5 à 9,0 ; carbone organique total de 0,8 à 7,0 % ; lipides < 50 mg/kg) contiennent des NTM à croissance rapide métabolisant des PAH, comme *M. anthracenicum*, *M. frederiksbergense*, *M. austroafricanum*, *M. hodleri* et *M. petroleophilum*, ou non, comme *M. alvei*, *M. moriokaense*, *M. lacus*, *M. mageritense*, *M. tusciae*, *M. gadium*, *M. isoniacini*, *M. holsaticum* et *M. septicum*, alors que les sols non pollués en PAH (pH de 7,0 à 8,9 ; carbone organique total de 1 à 7 % ; lipides de 50 à 4600 mg/kg) ne contiennent pas de NTM métabolisant les PAH (Leys *et al.* 2005). Effectivement, des NTM à croissance rapide sont capables de dégrader de nombreux composés xénobiotiques pouvant être présents dans les sols. Plus précisément, les NTM saprophytes à croissance rapide *M. anthracenicum*, *M. aromaticivorans*, *M. fluoranthenivorans*, *M. frederiksbergense*, *M. hodleri*, *M. pyrenivorans* et *M. vanbaalenii* sont connues pour dégrader certains PAH comme l'anthracène, le benzopyrène, le benzanthracène, le biphényle, le chrysène, le fluoranthène, le fluorène, le 1-nitropyrène, le phénanthrène et/ou le pyrène (Tableau 8). Ces espèces de NTM pouvant dégrader des PAH, ont toutes été isolées de sols ou de sédiments pollués par ces composés, reflétant une nouvelle fois les capacités d'adaptation à l'environnement des NTM. Plus précisément, les gènes *nidA* et *nidB* (α and β subunit ring-hydroxylating dioxygenase) codant les sous-unités α et β des déshydrogénases de cycles aromatiques sont présents chez les NTM *M. vanbaalenii*, *M. flavescens* PYR-GCK, *M. gilvum* BB1 et *M. frederiksbergense* FAn9, qui sont connues pour leurs capacités de dégradation des PAH (Brezna *et al.* 2003). Tout comme pour le genre bactérien *Sphingomonas* qui est aussi capable de dégrader les PAH, il semble que la structure des communautés du genre *Mycobacterium* soit commandée par la biodisponibilité des PAH dans les sols (Uyttebroek *et al.* 2007a). Effectivement, les NTM capables de dégrader les PAH sont principalement associées à la fraction argileuse des sols (Uyttebroek *et al.* 2006). De plus, la NTM à croissance rapide *M. montefiorensis* semble dominer la minéralisation du pyrène à pH 3-5, alors que dans un sol à pH 7 le pyrène semble d'avantage être utilisé par une communauté de NTM à croissance lente (Uyttebroek *et al.* 2007b). Sans rapport direct avec la croissance, une NTM proche de *M. diernhoferi* a aussi été décrite comme ayant des capacités de dégradation d'un autre type de xénobiotique : l'endosulfan, un insecticide (Sutherland *et al.* 2002). Mais ce type de dégradation reste néanmoins peu décrit chez les NTM. D'autre part, certaines NTM ont acquis des résistances à certains xénobiotiques métalliques pouvant polluer les sols, comme par exemple *M. marinum* (Stinear *et al.* 2010) et *M. abscessus* (Ripoll *et al.* 2009), qui possèdent un plasmide de résistance au mercure. Là encore, ce type de dégradation de xénobiotiques reste très peu décrit chez les NTM.

Tableau 8 : Mycobactéries non-tuberculeuses isolées de sols pollués et capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Espèce de mycobactérie	Nom de la souche	Contamination du sol	Composés dégradés	Référence
<i>M. anthracenicum</i>	Y15709	industrie	non détaillé	(Wang <i>et al.</i> 1998)
<i>M. aromaticivorans</i>	JS19b1	charbon	non détaillé	(Hennessee <i>et al.</i> 2009)
<i>M. fluoranthivorans</i>	FA4	charbon	fluoranthène	(Hormisch <i>et al.</i> 2004)
<i>M. frederiksbergense</i>	-	charbon	phénanthrène, fluoranthène, pyrène	(Willumsen <i>et al.</i> 2001)
<i>M. hodleri</i>	EMI2	fluoranthène	phénanthrène, fluorène, pyrène, anthracène, fluoranthène	(Kleespies <i>et al.</i> 1996)
<i>M. pyrenivorans</i>	17A3	industrie	phénanthrène, fluoranthène, pyrène	(Derz <i>et al.</i> 2004)
<i>M. vanbaalenii</i>	PYR-1	pétrole	chrysène, anthracène, fluoranthène, 1-nitropyrene, phénanthrène, biphényl, benzopyrène	(Khan <i>et al.</i> 2002)
non déterminée	RJGII-135	charbon	pyrène, benzanthracène, benzopyrène,	(Schneider <i>et al.</i> 1996)
non déterminée	PC01	sédiments d'estuaires	phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, et benzanthracène	(Rockne <i>et al.</i> 2003 ; Shor <i>et al.</i> 2003)

• **Utilisation des composés carbonés biotiques**

La croissance des NTM en biofilm dans les canalisations d'eau potable serait favorisée par la présence de matière organique (Falkinham *et al.* 2001), d'autant plus que les NTM et la matière organique se concentrent dans le même compartiment, à savoir l'interface eau/air (George et Falkinham 1989 ; Falkinham *et al.* 2004), en raison du phénomène d'adsorption préférentielle due à leur forte hydrophobicité (Falkinham 2004). Dans l'environnement, les NTM utilisent aussi ce phénomène d'adsorption préférentielle pour capter les éléments nutritifs organiques de petites tailles, afin de se multiplier même lorsque leur environnement est pauvre en matière organique (Primm *et al.* 2004). Néanmoins, aucune donnée n'est disponible sur le processus de dégradation de la matière organique par les NTM en milieu naturel.

Alors que la littérature sur l'utilisation des lipides dans l'environnement par les NTM est quasiment inexistante, celle sur leurs voies d'assimilation et de biosynthèse est profuse. Sans décrire l'ensemble des facettes de la littérature à ce sujet, les mycobactéries peuvent incorporer par endocytose les acides gras, comme l'acide palmitique ou l'acide oléique, sous forme libre ou de triglycéride (Goren 1972). Sur le plan génétique, le métabolisme lipidique des mycobactéries comporte pas moins de 250 enzymes, incluant des enzymes homologues à ceux rencontrés chez les plantes et les animaux (Marri *et al.* 2006). Le catabolisme lipidique des mycobactéries est très décrit, et est majoritairement régi par l'opéron *fad* (fatty acid degradation operon) de dégradation des acides gras, qui semble assez conservé chez les espèces *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, et MAP (Marri *et al.* 2006). A titre de comparaison avec une autre bactérie, *E. coli*, les espèces de mycobactéries contiennent environ cinq fois plus de gènes contrôlant le catabolisme lipidique (Primm *et al.* 2004). Plus précisément, le répresseur transcriptionnel de la 3-cétostéroïde $\Delta 1$ -déhydrogénase, codé par le gène *kstR* (3-ketosteroid $\Delta 1$ -dehydrogenase), contrôlerait chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*, l'expression de 83 et 73 gènes codant l'utilisation de divers lipides comme source énergétique (Kendall *et al.* 2007). Ce gène *kstR* avait été décrit initialement comme jouant un rôle dans le catabolisme du cholestérol chez des actinomycètes du sol comme *Rhodococcus* et dans la survie de *M. tuberculosis* dans les macrophages (van der Geize *et al.* 2007). De plus, un second gène régulateur transcriptionnel nommé *kstR2* a été récemment décrit comme contrôlant 15 gènes du catabolisme du cholestérol chez *Mycobacterium* et *Rhodococcus* (Kendall *et al.* 2010). Concernant l'anabolisme lipidique des mycobactéries, ce

dernier est basé sur l'élongation d'unités successives de malonyl-coenzyme A, ramifiées ou non (Goren 1972), et est contrôlé par 65 gènes en commun dans les génomes de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, et MAP (Marri *et al.* 2006). Outre la production d'énergie, le métabolisme lipidique des mycobactéries joue un rôle majeur dans la production des constituants lipidiques de leur paroi.

II / Les outils analytiques applicables aux matrices environnementales

Jusqu'à présent la recherche sur les NTM a focalisé son attention sur les espèces d'intérêt en médecine humaine et vétérinaire ainsi que sur les espèces présentant des capacités de dégradation des PAH. Par conséquent, les outils analytiques actuels ne sont pas adaptés à l'étude des NTM dans l'environnement en général. Effectivement, les outils analytiques de détection, d'identification et de caractérisation des mycobactéries sont majoritairement issus de développements pour des applications dans le milieu médical ou vétérinaire. Ainsi, ces outils qui n'ont pas les mêmes objectifs, ne sont pas toujours applicables à des matrices environnementales, et l'étude des mycobactéries dans l'environnement nécessite une synthèse méthodologique avant tout développement à ce type de matrices.

II.1 / La détection et la quantification

II.1.a / Par microscopie

- ***La propriété tinctoriale***

La richesse lipidique de la paroi des AFB, dont fait partie les mycobactéries, leur confère une résistance aux acides et aux bases. Cette résistance est à la base de la procédure de référence de coloration des AFB, appelée coloration de Ziehl-Neelsen. Cette méthode, à chaud, colore à la fuchsine, décolore à l'acide et l'alcool et contraste au bleu de méthylène. D'autre coloration des AFB peuvent se faire à froid comme la coloration de Kinyoun qui utilise les mêmes réactifs que la coloration de Ziehl-Neelsen, la coloration de Tan-Thiam-Hok qui colore avec une solution de Kinyoun et décolore avec une solution de Gabett, et la coloration de Degommier qui colore à l'auramine, décolore à l'alcool et contraste au rouge de thiazine. Les colorations de Ziehl-Neelsen, Kinyoun et Tan-Thiam-Hok permettent d'observer en microscopie photonique les AFB en rouge orangé sur fond bleu, et la méthode de Degommier permet de les observer en microscopie à fluorescence en vert jaune sur fond rouge orangé (Euzéby 2010). Ces méthodes ne sont pas spécifiques des mycobactéries, car elles peuvent aussi colorer d'autres bactéries comme, par exemple, les genres *Nocardia*, *Legionella* ou *Corynebacterium* (Shinnick et Good 1994). Ces méthodes de détection par coloration ne permettent donc pas d'identifier les AFB détectés et nécessitent d'autres investigations par bactériologie ou biologie moléculaire, qui seront exposées par la suite. De plus, les seuils de détection et de quantification des ces méthodes sont très faibles (Woods et Walker 1996 ; Selvakumar *et al.* 2006). En conséquence l'application de ces dernières peut peut-être suffire pour détecter ou quantifier les AFB dans des matrices fortement contaminées comme les échantillons pathologiques, mais est peu efficace pour des matrices faiblement contaminées comme les échantillons environnementaux.

- ***L'hybridation in situ***

La méthode par hybridation *in situ* fluorescente (fluorescent *in situ* hybridization: FISH) est une technique cytogénétique permettant de détecter spécifiquement des éléments génétiques à l'intérieur même d'une cellule. Elle peut donc être employée pour quantifier spécifiquement des microorganismes dans des matrices complexes, mais seulement pour les espèces connues pour lesquelles des sondes spécifiques ont été développées. Elle nécessite toutefois de connaître un élément nucléique conservé uniquement au sein du microorganisme étudié, afin d'y hybrider une sonde complémentaire marquée par une molécule fluorescente, comme la fluorescéine isothiocyanate et la cyanine-3, ou par un antigène révélé par conjugaison d'un anticorps fluorescent. Les échantillons traités sont ensuite observés en

microscopie par fluorescence. La méthode FISH a fait l'objet de développement pour détecter spécifiquement les espèces de NTM *Mycobacterium kansasii* et *M. avium* dans des échantillons cliniques (Lefmann *et al.* 2006), *M. avium* dans les biofilms des réseaux de distribution d'eau (Torvinen *et al.* 2007), et *M. avium* ssp. *paratuberculosis* dans des échantillons cliniques de patients atteints de la maladie de Crohn (Jeyanathan *et al.* 2006) et dans des biofilms de réseaux de distribution d'eau (Lehtola *et al.* 2006). *M. avium* ssp. *paratuberculosis* est aussi suspectée d'être l'agent responsable de la maladie de Crohn chez l'humain, une infection grave du colon (Thorel 1989). A ce jour l'utilisation de la méthode FISH est donc limitée à la détection de quelques espèces du genre *Mycobacterium*, et aucune méthode de ce type ne permet de détecter l'ensemble de ce genre bactérien.

II.1.b / Par culture

Ces méthodes reposent toutes sur l'élimination des microorganismes non mycobactériens en utilisant les facultés de résistance des mycobactéries à certains antibiotiques et aux composés acido-basiques. Les méthodes de quantification des NTM dans l'eau ne sont pas normalisées : il n'existe pas de consensus sur la méthode de décontamination et le 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 NTM dans l'eau.

- ***Les méthodes de concentration de l'échantillon***

La recherche des NTM 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 (Iivanainen *et al.* 1993 ; Kamala *et al.* 1994 ; Torkko *et al.* 2001), à 0,45 µm (Neumann *et al.* 1997 ; Le Dantec *et al.* 2002b), à 0,45 µm suivi d'un décrochage des cellules au dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate: SDS) (Stinear *et al.* 2000 ; Pickup *et al.* 2005), à 0,45 µm suivi d'un dépôt direct sur milieu de culture (Hilborn *et al.* 2006), ou par centrifugation (Lumb *et al.* 2004 ; Parashar *et al.* 2004). La méthode de concentration des échantillons d'eau de l'environnement n'est donc pas normalisée actuellement.

- ***Les milieux d'isolement solide***

En raison des exigences métaboliques des NTM, la quantification par isolement de ces dernières nécessite l'utilisation de milieux de culture solide complexes comme le milieu au jaune d'œuf d'Ogawa (ogawa egg yolk medium: OEY), le milieu d'Ogawa à l'ofloxacin éthambutol (ogawa medium ofloxacin ethambutol: OEOE), le milieu sélectif de Falkinham (Falkinham's selective medium: FSM), le milieu de Lowenstein-Jensen (LJ medium), le Middlebrook 7H10 (Carson *et al.* 1988 ; Kamala *et al.* 1994 ; Neumann *et al.* 1997), ou le Middlebrook 7H11 qui correspond au Middlebrook 7H10 additionné d'un additif constitué d'acide oléique, d'albumine bovin, de chlorure de sodium, de dextrose et de catalase (oleic acid, bovine albumin, sodium chloride, dextrose, catalase: OADC), qui augmente la sensibilité aux mycobactéries (Cage 1994). Tous ces milieux solides de culture peuvent être additionnés de mycobactine J un sidérophore nécessaire pour cultiver certaines espèces comme *M. avium* spp *paratuberculosis* (Whittington *et al.* 1999 ; Donaghy *et al.* 2003 ; Sung et Collins 2003 ; Sung *et al.* 2004 ; de Juan *et al.* 2006). Néanmoins, la richesse de ces milieux implique le développement de microorganismes non mycobactériens interférents, qui entravent le développement des NTM, en particulier celui des NTM à croissance lente. Ceci est le cas pour des échantillons cliniques, vétérinaires et environnementaux. L'utilisation de milieux pauvres en conditions oligotrophiques pourrait aussi constituer une alternative pour isoler les NTM de l'environnement, car ces dernières sont peut-être moins exigeantes que celles isolées en milieu clinique.

- **Les suppléments antibiotiques**

Afin de limiter les microorganismes interférents, le milieu de culture Middlebrook 7H11_j peut être supplémenté en antibiotiques. En milieu hospitalier, pour la détection automatisée en milieux liquides, il est notamment utilisé le complexe d'antibiotiques constitué en 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 (Anargyros *et al.* 1990 ; Stager *et al.* 1991 ; Conville *et al.* 1995 ; Realini *et al.* 1997 ; Brunello *et al.* 1999 ; Leitritz *et al.* 2001) (polymyxin B, amphotericin, nalidixic acid, de trimethoprim, azlocillin: PANTA). Ces concentrations ont déjà été utilisées dans du milieu solide Middlebrook 7H11 (Donaghy *et al.* 2003). Certains auteurs, dans le cas d'échantillons très contaminés, utilisent de la vancomycine à des concentrations de 8,4 µg/ml (Donaghy *et al.* 2003), 10 µg/ml (Collins *et al.* 1990 ; Carbonnelle *et al.* 1996) ou encore 20 µg/ml (Anargyros *et al.* 1990) dans le milieu de culture.

- **Les décontaminants chimiques**

Les caractéristiques d'acido-alcool-résistance des mycobactéries 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 (H₂SO₄ à 4 % v/v) est généralement utilisée pour des échantillons médicaux et vétérinaires très contaminés (Ezold *et al.* 1968 ; Mitchison et Aber 1974 ; Thorel et Boisvert 1976 ; Ambrosio *et al.* 2008), et a aussi été appliquée sur de l'eau de l'environnement (Kamala *et al.* 1994). La méthode de Petroff (Petroff 1915) (NaOH à 4 % v/v) est toujours utilisée en milieu médical (Wang *et al.* 2004 ; Kunst *et al.* 2006 ; Salem *et al.* 2007), et a été testée sur de l'eau artificiellement contaminée (Palomino et Portaels 1998). Une méthode plus récente (SDS-NaOH à 3 %-1 % v/v) appelée Tacquet-Tison (Tacquet et Tison 1961 ; Tacquet et Tison 1966) a été initialement appliquée à des échantillons cliniques (Narasimhan *et al.* 1972 ; Doucet-Populaire *et al.* 1996 ; Álvarez *et al.* 2008 ; Ruiz-Manzano *et al.* 2008), et a été utilisée sur de l'eau de l'environnement (Kamala *et al.* 1994) et de l'eau d'usines de potabilisation (Le Dantec *et al.* 2002b). Une méthode aussi récente (NaOH-NALC à 2 %-0,5 % v/v) appelée Kubica (Kubica *et al.* 1964) est recommandée par les centres américains de maîtrise des maladies (centers of disease control: CDC) pour les échantillons médicaux en particulier les expectorations. Cette dernière a été utilisée sur de l'eau artificiellement contaminée (Thornton *et al.* 1998) et semble convenir à des échantillons très contaminés par des microorganismes interférents comme des fèces (Yajko *et al.* 1993). Deux méthodes non référencées sont aussi à noter : la méthode à l'acide oxalique (COOH)₂ et la méthode au chlorure de cetylpyridinium (cetylpyridinium chloride: CPC). La méthode à l'acide oxalique à 5 % v/v est parfois utilisée en milieu médical (Whittier *et al.* 1993 ; Bange *et al.* 1999 ; Bange et Böttger 2002) et semble convenir à des échantillons très contaminés par des microorganismes interférents comme des fèces (Yajko *et al.* 1993). La méthode au CPC (0,005 % finale) proposée pour décontaminer de l'eau peu contaminée (Schulze-Röbbecke *et al.* 1991) a été utilisée pour rechercher les mycobactéries dans de l'eau potable domestique (Tsintzou *et al.* 2000 ; Norton *et al.* 2004 ; Thomson *et al.* 2008) et hospitalière (Vantarakis *et al.* 1998). Néanmoins, il est conseillé d'utiliser des concentrations plus fortes (0,05 % finale) pour traiter l'eau très contaminée (Neumann *et al.* 1997).

II.1.c / Par chromatographie

Récemment, des outils basés sur la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (gas chromatography–mass spectrometry: GC–MS), ont vu le jour pour détecter des biomarqueurs potentiels de *M. tuberculosis*, comme l'acide hexacosanoïque dans des échantillons cliniques (Kaal *et al.* 2009), plusieurs acides mycoliques dans les os anciens de plus de 1400 ans (Minnikin *et al.* 2010) ou les acides mycocérosiques, en particulier les cires de phthiocérol dimycocérosates dans des squelettes (Redman *et al.* 2009). Néanmoins, ces méthodes se focalisent sur *M. tuberculosis*, et ne sont donc pas utilisables pour détecter le genre *Mycobacterium* ou des espèces de NTM. D'autre part, une étude a proposé la chromatographie liquide de haute performance (high performance liquid chromatography: HPLC) couplée à des spectromètres de masse en tandem dans l'objectif de détecter différents microorganismes dans des échantillons cliniques et environnementaux. Cette méthode est basée sur la caractérisation de lipides membranaires (lipides neutres et phospholipides), de dérivés de spores bactériens, de l'acide 2,6-dipicolinique stabilisant les acides nucléiques des Gram positifs en état de dormance et du lipopolysaccharide qui est l'endotoxine caractéristique des Gram négatifs (White *et al.* 2002). Néanmoins, ces méthodes nécessitent des bases de données exhaustives de profils spectrométriques par microorganismes, qui pour le jour n'ont pas fait l'objet de développements inter-laboratoires (White *et al.* 2002 ; Kaal *et al.* 2009 ; Redman *et al.* 2009 ; Minnikin *et al.* 2010). Bien que prometteuses, les méthodes de détection des microorganismes dans les matrices environnementales basées sur des outils de chromatographie, sont toujours au stade de développement.

II.1.d / Par outils moléculaires

En raison de la faible spécificité des outils microscopiques, de la lourdeur analytique des méthodes chronophages de culture et de l'absence de recul sur les méthodes chromatographiques, la détection et la quantification des NTM a fait l'objet de beaucoup plus de développement d'outils analytiques en biologie moléculaire.

- ***Les amorces de la littérature***

Les amorces de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction: PCR) de la littérature, ciblant différents loci des gènes de ménage *sodA* (superoxyde dismutase) codant la superoxyde dismutase, *recA* (homologous recombination) codant la recombinase, *rpoB* (RNA-polymerase) codant l'ARN-polymérase, *rrs* (16S rRNA) codant l'ARNr 16S), *hsp65* (stress-heat shock protein) codant une protéine de résistance aux chocs thermiques, ainsi que *gyrA* et *B* (gyrase subunit A and B) codant les sous unités A et B de la gyrase, ont été dessinées dans des objectifs d'identification et/ou de détection par analyse de séquences multi-loci (multi locus sequencing analysis: MLSA), polymérisation en chaîne et analyse par restriction enzymatique (polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis: PCR-REA), PCR classique ou PCR en temps réel (Tableau 9).

Tableau 9 : Amorces ciblant le genre *Mycobacterium* dans des objectifs d'identification ou de détection

Gène	sens	anti-sens	Taille (pb)	Application	Référence
<i>sodA</i>	SodF	SodR	464	Identification par MLSA	(Domenech <i>et al.</i> 1997 ; Adékambi et Drancourt 2004)
	Z261	Z212	434	Identification par hybridation ou MLSA	(Zolg et Philippi-Schulz 1994 ; Gomila <i>et al.</i> 2007)
<i>recA</i>	recF1	recR1	900	Identification par MLSA	(Blackwood <i>et al.</i> 2000)
	recF3	recR2	900	Identification par MLSA	(Blackwood <i>et al.</i> 2000)
<i>rpoB</i>	RPO5V	RPO3V	360	Identification par PCR-REA	(Cheunoy <i>et al.</i> 2005)
	M5	RM3	136	Détection par PCR	(Kim <i>et al.</i> 2004 ; Mokaddas et Ahmad 2007)
<i>Rrs</i>	110F	264R et I571R	475	Détection par PCR nichée	(Garcia-Quintanilla <i>et al.</i> 2002)
	pmyc14	pmyc7	200	Détection et quantification par PCR en temps réel	(Kox <i>et al.</i> 1995 ; Dutil <i>et al.</i> 2007)
	MYC-12	MYC-13	300-400	Identification par PCR-REA	(Dobner <i>et al.</i> 1996)
	285F	264R	1000	Identification par MLSA	(Kirschner <i>et al.</i> 1993)
	8FPL	1492	1400	Identification par MLSA	(Turenne <i>et al.</i> 2001 ; Cook <i>et al.</i> 2003 ; Gomila <i>et al.</i> 2007)
	F246	R266-267	620	Détection par PCR	(Böddinghaus <i>et al.</i> 1990)
	FWu	RWu	270	Identification par séquençage ou dotblot	(Wu <i>et al.</i> 2007)
	29-45	242-227	200	Distinction des NTM du MTC par PCR en temps réel	(Shrestha <i>et al.</i> 2003)
	mycF	mycR	473	Détection et identification par séquençage	(Mendum <i>et al.</i> 2000 ; Chilima <i>et al.</i> 2006)
	<i>gyrA</i>	Pri9	Pri8	110	Détection de la résistance aux quinolones
<i>gyrB</i>	GyrbA	GyrbE	117	Détection de la résistance aux quinolones	(Dauendorffer <i>et al.</i> 2003)
	F119	R184T7	184	Identification par hybridation microarray	(Fukushima <i>et al.</i> 2003)
<i>hsp65</i>	65kDaf2	65kDar3	110	Détection et quantification par PCR en temps réel	(Tobler <i>et al.</i> 2006)
	MACHspF_574	MACHsp65R	1059	Identification par séquençage	(Turenne <i>et al.</i> 2006)
	Tb11	Tb12	360-439	Distinction des espèces du MAC par séquençage	(Swanson <i>et al.</i> 1997)
				Identification par séquençage	(Smole <i>et al.</i> 2002 ; McNabb <i>et al.</i> 2004 ; Yzquierdo <i>et al.</i> 2007)
				Distinction des espèces du MAC par PCR-REA	(Oliveira <i>et al.</i> 2003 ; Prammananan <i>et al.</i> 2006)
			Identification par PCR-REA	(Telenti <i>et al.</i> 1993 ; Domenech <i>et al.</i> 1997 ; Cheunoy <i>et al.</i> 2005 ; Bannalikal et Verma 2006)	

MAC: *Mycobacterium avium* complex, MLSA: multi locus sequencing analysis, NTM: non-tuberculous mycobacteria, MTC: *Mycobacterium tuberculosis* complex, PCR-REA: polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis.

Parmi ces amorces dessinées pour des applications médicales (Tableau 9), certains auteurs indiquent une spécificité des ces dernières vis-à-vis du genre *Mycobacterium* (Böddinghaus *et al.* 1990 ; Kox *et al.* 1995 ; Mendum *et al.* 2000 ; Garcia-Quintanilla *et al.* 2002 ; Kim et Yur 2004 ; Chilima *et al.* 2006 ; Tobler *et al.* 2006 ; Dutil *et al.* 2007 ; Mokaddas et Ahmad 2007), mais aucune étude n'a synthétisé la sensibilité et la spécificité de ces dernières. Il est néanmoins possible de comparer ces amorces (Tableau 9) en estimant leur sensibilité et la spécificité théorique (Figure 5) par l'algorithme de recherche d'alignements locaux principaux (basic local alignment search tool: BLAST) du centre national américain d'information en biotechnologie (national center for biotechnology information: NCBI). Mon étude révèle des sensibilités et spécificités théoriques très variables entre ces amorces (Figure 5), qu'elles aient été développées dans un objectif de spécificité concernant les applications d'identification ou dans un objectif de spécificité concernant les applications de détection (Tableau 9). Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de consensus sur les gènes et la position à cibler pour détecter spécifiquement les mycobactéries. De plus l'ensemble des designs d'amorces a été réalisé en utilisant des microorganismes d'origine médicale, et aucune étude de spécificité n'a pour lors été conduite en utilisant des microorganismes d'origine environnementale. Par ailleurs, il est à noter une récente technologie nommée Luminex qui fonctionne sur le couplage d'une sonde protéique ou moléculaire à des billes inertes ou magnétiques. L'hybridation de la sonde à la cible est révélée classiquement par fluorescence et, sans prendre en compte la méthode d'extraction d'ADN, l'utilisation de billes permettrait d'abaisser les limites de détection. Cette technologie a été proposée pour détecter et quantifier des microorganismes pathogènes dans l'eau (Griffith *et al.* 2009), mais n'a pour le moment ni été appliquée au NTM, ni fait l'objet de comparaison avec d'autres méthodes de quantification moléculaires.

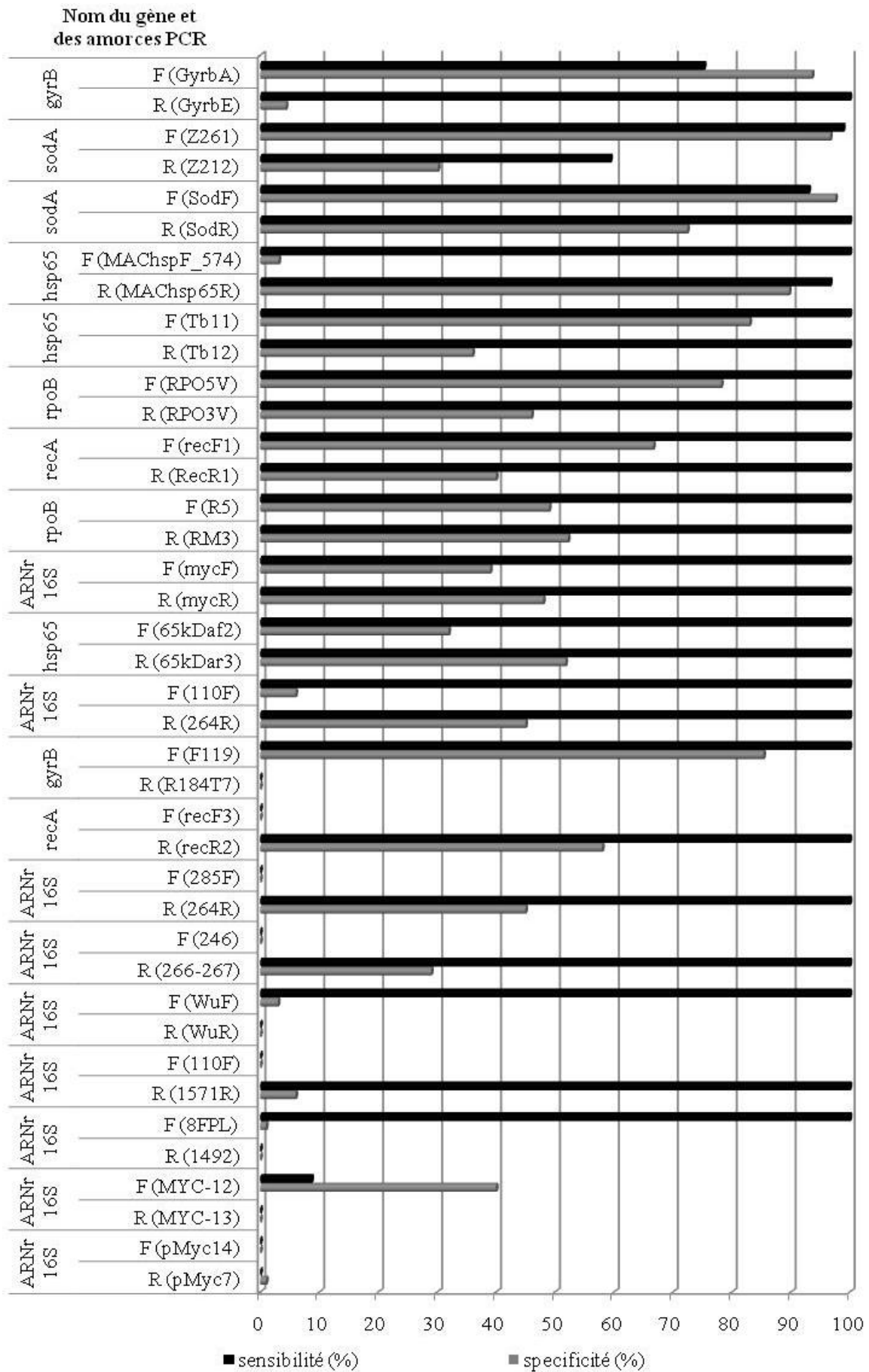


Figure 5 : Sensibilité et spécificité théoriques des couples d'amorces sens (F) et anti-sens (R) de la littérature vis-à-vis du genre *Mycobacterium* sur la base du nombre de résultats présentant un pourcentage de similitude supérieur à 90 % sur les 100 premiers résultats de BLAST réalisés sur NCBI

II.2 / L'identification

II.2.a / La caractérisation biochimique

L'identification biochimique des NTM en microbiologie clinique repose sur la classification de Runyon (Timpe et Runyon 1954), qui est basée sur la vitesse de croissance et sur la pigmentation que prennent les souches dans différentes conditions (Annexe 4). C'est cette méthode qui est toujours utilisée pour caractériser les nombreuses espèces de NTM qui continuent à être décrites actuellement. Concernant l'identification des NTM par la classification de Runyon, après avoir déterminé le groupe de NTM auquel appartient la souche à identifier (Annexe 4), l'identification de son espèce nécessite des tests biochimiques complémentaires de croissance (Euzéby 2010) en présence de certains composés, et de résistance à certains agents chimiques (Annexe 5, Annexe 6, Annexe 7 et Annexe 8). L'identification biochimique d'une NTM de l'environnement qui ne soit pas d'intérêt clinique repose sur la même classification, mais il n'y a pas actuellement de synthèse des caractères biochimiques des plus de 150 espèces décrites. Ce manque de synthèse sur les méthodes d'identification biochimiques des NTM d'origine environnementale ne permet donc pas d'identifier l'ensemble des espèces en appliquant ces méthodes développées initialement en milieu clinique.

II.2.b / La caractérisation des acides mycoliques

La caractérisation biochimique des nouvelles espèces de NTM s'accompagne aussi de la caractérisation des acides mycoliques de la paroi mycobactérienne. Effectivement, la différenciation des genres au sein du groupe CNM (Butler *et al.* 1986), et l'identification d'une espèce de NTM peut aussi se faire en se basant sur la caractérisation de ses acides mycoliques par HPLC en utilisant une colonne C18 pour phase stationnaire et un mélange méthanol-dichlorométhane en phase mobile (Steck *et al.* 1978 ; Butler et Kilburn 1990 ; Butler *et al.* 1991 ; Ridderhof *et al.* 1991 ; Butler *et al.* 1992 ; Cage 1992 ; Duffey et Guthertz 1992 ; Raffi *et al.* 1992 ; Guthertz *et al.* 1993 ; Thibert et Lapierre 1993 ; Cage 1994 ; Duffey *et al.* 1996). Les CDC, qui ont normalisé ce protocole, préconisent l'utilisation des profils d'acides mycoliques de sa base de données et du logiciel pirouette pattern recognition software (InfoMetrix, Woodinville, Wash.). De plus, certains laboratoires indépendants proposent leur propre base de données de profils d'acides mycoliques comme par exemple le centre régional de référence du diagnostic des mycobactéries du Pr. Tortoli en Italie (<http://www.mycobactoscana.it/index.htm>). La caractérisation des acides mycoliques peut aussi se faire par chromatographie sur couche mince, mais cette technique n'est utilisée que pour caractériser les espèces d'intérêt médical et n'a pas été adaptée pour la description de nouvelles espèces (Leite *et al.* 1998). Néanmoins, dans le contexte d'augmentation des descriptions d'espèces, les bases de données des profils d'acides mycoliques n'intègrent pas l'ensemble des nouvelles espèces de NTM décrites, sans parler des comparaisons inter-laboratoires qui nécessiteraient des protocoles HPLC rigoureusement identiques.

II.2.c / L'hybridation inverse ou non

Dans le milieu médical, il existe différentes méthodes d'identification des mycobactéries reposant sur le principe de l'hybridation ADN/ADN. Plus précisément ces méthodes intègrent l'amplification partielle d'un gène par PCR, suivie de l'hybridation ADN/ADN d'une sonde spécifique de l'espèce puis d'une révélation de cette hybridation. En pratique ces méthodes d'identification se font sur des bandelettes sur lesquelles sont fixées à différents niveaux des sondes spécifiques des espèces recherchées et le produit PCR marqué est mis en contact avec cette bandelette afin de permettre l'hybridation avec les sondes. Ces méthodes d'identification par hybridation inverse (reverse-blot) sur bandelette sont commercialisées sous le nom de Inno-LiPA Mycobacterial v2 (Innogenetics) et GenoType CM/AS (Hain Lifesciences), et respectivement peuvent identifier 16 (Tortoli *et al.* 2003) et 14 (Richter *et al.* 2006) espèces de mycobactéries à partir d'une culture pure en ciblant

l'ARNr 16S (gène *rrs*) ou l'ARNr 23S (gène *rrl*). Ces méthodes ne permettent donc pas d'identifier l'ensemble des espèces de NTM de l'environnement, d'autant plus que des identifications erronées ont déjà été observées. Effectivement, l'espèce *M. vulneris* qui fait partie du MAC, croise avec la sonde de *M. intracellulare* du GenoType CM/AS, alors que cette espèce du MAC est identifiée sans erreur comme une espèce des MAIS en utilisant le Inno-LiPA Mycobacterial v2 (van Ingen *et al.* 2009c). Il existe aussi une autre méthode commerciale nommée AccuProbe assays (Gen-Probe) qui fonctionne sur le principe d'une hybridation non inversée où le marquage est réalisé sur la sonde et non pas sur le produit PCR comme c'est le cas pour les méthodes Inno-LiPA Mycobacterial v2 et GenoType CM/AS. Cette méthode cible l'ARNr et permet d'identifier les espèces du MTC, les espèces du MAC, et les espèces *M. kansasii* et *M. gordonae* à partir de cultures pures (Reisner *et al.* 1994 ; Somoskövi *et al.* 2000). Pour cette méthode commerciale des erreurs d'identification ont aussi été observées comme l'espèce *M. saskatchewanense* qui avait été identifiée comme *M. avium* (Turenne *et al.* 2004b), l'espèce *M. palustre* qui croise avec la sonde du MAC (Torkko *et al.* 2002), ainsi que l'espèce *M. celatum* qui peut être attribuée au MTC (Somoskövi *et al.* 2000). Tout comme les méthodes Inno-LiPA Mycobacterial v2 et GenoType CM/AS, la méthode AccuProbe assays ne convient pas à l'identification des NTM environnementales en raison du fait qu'elles ont été développées pour des échantillons cliniques et que certaines erreurs d'identification ont déjà été observées.

II.2.d / Le séquençage multi-locus

Après la première espèce de NTM décrite en 1889 (Trevisan 1889b) : *M. smegmatis* qui a initialement été baptisé *Bacillus smegmatis* (Lehmann et Neuman 1899a), 48 espèces de NTM ont été décrites jusqu'en 1981 sur la base des identifications biochimiques, puis 63 nouvelles descriptions ont été faites entre 1981 et 2007 avec les outils génotypiques, en particulier le séquençage (Kazda 2009). Ces outils génotypiques sont d'un intérêt majeur pour le milieu médical, car ils pallient, d'une part, la faible sensibilité des méthodes de détection microscopiques par coloration de Ziehl-Neelsen, coloration à auramine-rhodamine, ou coloration de Kinyoun (Woods et Walker 1996 ; Selvakumar *et al.* 2006) et, d'autre part, la lenteur et la complexité des méthodes d'identification phénotypiques basées sur la caractérisation des acides mycoliques de la paroi, ou sur la caractérisation biochimique du métabolisme. Dans le domaine de la recherche appliquée à l'environnement, le séquençage permet en plus de pallier le fait que les méthodes d'hybridation inverse ou non (Inno-LiPA Mycobacterial v2, GenoType CM/AS et la méthode AccuProbe assays) ne peuvent pas identifier l'ensemble des espèces de NTM décrites.

Tout comme pour l'ensemble du règne bactérien, le séquençage du gène *rrs* est la référence pour identifier les NTM, et bien qu'ajoutant un pouvoir de discrimination additionnel, les compléments d'analyse par le séquençage des gènes *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB* ou *sodA*, restent peu décrits chez les mycobactéries (Adékambi et Drancourt 2004 ; Gomila *et al.* 2007). Le séquençage des gènes *recA*, *hsp65* ou *gyrB*, semble apporter un complément analytique au séquençage de *rrs*, en raison d'un pouvoir de discrimination additionnel (Adékambi et Drancourt 2004 ; Gomila *et al.* 2007). En particulier le gène très polymorphe *hsp65* est souvent utilisé pour identifier des NTM par MLSA (Domenech *et al.* 1997 ; Swanson *et al.* 1997 ; McNabb *et al.* 2004) ou par d'autres méthodes de biologie moléculaire, comme la PCR-REA (Telenti *et al.* 1993 ; Oliveira *et al.* 2003 ; Cheunoy *et al.* 2005 ; Bannalikal et Verma 2006 ; Prammananan *et al.* 2006 ; Yzquierdo *et al.* 2007) et la RFLP (Oliveira *et al.* 2003). En addition du séquençage du gène *rrs*, le gène *recA* semble être aussi une cible d'intérêt dans un objectif d'identification des NTM par MLSA (Adékambi et Drancourt 2004 ; Gomila *et al.* 2007), car les séquençages de ces deux gènes semblent présenter des degrés de robustesse similaires (Adékambi et Drancourt 2004). Concernant le séquençage partiel du gène *gyrB* semblant présenter un pouvoir de discrimination additionnel au séquençage du gène *rrs* (Gomila *et al.* 2007), cette hypothèse n'a pour le moment pas été

corroborée par d'autres études, mais semble d'intérêt pour déterminer la résistance des mycobactéries aux quinolones (Guillemin *et al.* 1995; Guillemin *et al.* 1998; Dauendorffer *et al.* 2003). A l'exception de l'utilisation du gène *rpoB* pouvant différencier les espèces *M. kansasii* et *M. gastri* (Kim *et al.* 1999), l'utilisation des gènes *rpoB* ou *sodA* ne semble pas apporter de pouvoir de discrimination additionnel au séquençage du gène *rrs* dans un objectif d'identification des NTM par MLSA. Effectivement, ces gènes *rpoB* ou *sodA* présenteraient des degrés de similitude inter-espèces semblables voire supérieurs aux degrés de similitude inter-espèces du séquençage du gène *rrs* (Adékambi et Drancourt 2004 ; Gomila *et al.* 2007). Néanmoins, le séquençage de *rpoB* présente un intérêt pour apprécier la résistance des mycobactéries à la rifampicine (Kim *et al.* 2007 ; Ozkutuk *et al.* 2007 ; Rigouts *et al.* 2007 ; Soudani *et al.* 2007). La comparaison de ces différentes cibles de séquençage reste toutefois une tâche complexe car une multitude de paires d'amorce PCR ont été décrites pour séquencer différentes parties de ces gènes (Figure 6), qui par conséquent ne sont pas toujours totalement séquencés, ni même séquencés sur les mêmes positions. C'est pour ces raisons qu'il n'existe pas actuellement de consensus sur les zones de séquençage à privilégier pour identifier les NTM.

- **Séquençage du gène *rrs***

L'identification des NTM par séquençage du gène *rrs* est plus rapide (1 à 2 jours), mais aussi moins onéreuse (environ 47 USD par souches) que les méthodes biochimiques prenant entre 2 et 6 semaines, pour un coût de 80 USD à 173 USD en fonction de l'espèce identifiée (Cook *et al.* 2003). Le séquençage du gène *rrs*, mesurant 1516 pb, et codant l'ARNr de la sous-unité 16S du ribosome (positions 1487542 à 1489058 sur le chromosome de *M. avium* 104 Gene Bank NC_008595), est la référence pour identifier les bactéries par séquençage (Figure 6). Pour l'ensemble du règne bactérien, il est souvent utilisé une amorce sens 8F en combinaison avec une amorce anti-sens 907R (Ben-Dov *et al.* 2006) ou 1512R (Felske *et al.* 1997), donnant respectivement des amplifications d'environ 900 pb ou 1500 pb. La région encadrée par le couple 8F/1512R correspond, à quelques bases près, à celle encadrée par les couples 16F27/16R1492 (Gomila *et al.* 2007), Fd1/Rp2 (Adékambi et Drancourt 2004) et 8FPL/1492 (Turenne *et al.* 2001 ; Cook *et al.* 2003), utilisée pour séquencer la quasi-totalité de ce gène chez les mycobactéries. Les identifications des mycobactéries par séquençage du gène *rrs*, peuvent faire intervenir différents couples d'amorces d'amplification présentant des tailles d'amplification variables. Le séquençage de 2/3 du gène (environ 1025 pb sur le chromosome de *M. avium* 104 Gene Bank NC_008595) fait intervenir le couple d'amorce 285F/264R (Kirschner *et al.* 1993), qui est d'ailleurs utilisé sous le nom de UL1/UL2, pour identifier par séquençage les mycobactéries en première intention au centre national de référence des mycobactéries de la Pitié-Salpêtrière. Il existe aussi le système MicroSeq® 500, consistant à séquencer les 500 premières paires de bases du gène *rrs*. Cette méthode est utilisable pour l'ensemble des bactéries, mais nécessite, pour identifier des souches d'origine environnementale, l'utilisation d'une base de données publiques plus importante que les bases de données de différenciation ribosomale des microorganismes médicaux (ribosomal differentiation of medical microorganisms: RIDOM) internes au système (Cloud *et al.* 2002). Toujours concernant l'identification des mycobactéries, certains auteurs séquent 473 pb du gène *rrs* par le couple d'amorce mycF/mycR, car les amorces de ce couple semblent avoir plus de similarité pour les mycobactéries qu'avec les autres bactéries (Mendum *et al.* 2000 ; Chilima *et al.* 2006). Il est à noter que les régions de séquençage du système MicroSeq® et du couple d'amorces mycF/mycR, sont différentes, mais sont intégrées dans les régions plus larges encadrées par les couples d'amorces 285F/264R ou 8FPL/1492.

Le recours aux bases de données RIDOM, intégrés aux logiciels d'acquisition des données de séquençage, ne semble pas convenir à l'identification des mycobactéries. Effectivement, ces bases de données, qui reposent sur le séquençage des 500 première paire de base du gène *rrs*, ne permettent pas de différencier certaines NTM comme les espèces *M. gastri* et *M. kansasii*, les sous-espèces de l'espèce *M. avium*, les espèces *M. marinum* et *M. ulcerans*, les espèces *M. fallax*, *M. murale* et *M. tokaiense*, les espèces, *M. fortuitum* et *M. senegalense*, les espèces *M. peregrinum* et *M. septicum*, ainsi que les espèces *M. abscessus* et *M. chelonae* (Harmsen *et al.* 2003). D'autre part, et malgré que cela puisse engendrer une diminution des espèces identifiables, il semble que la création d'une base de données personnalisée, basée sur le séquençage de souches de références, soit plus fiable que les bases de données RIDOM intégrées aux logiciels d'acquisition des données de séquençage (Turenne *et al.* 2001). Le séquençage de la quasi-totalité du gène référence *rrs*, via le couple d'amorce 16F27/16R1492 (Gomila *et al.* 2007), qui est équivalent à quelques bases près à la région encadrée par les amorces 8FPL/1492 (Turenne *et al.* 2001 ; Cook *et al.* 2003), ne permet pas de différencier certaines espèces de NTM à croissance rapide (Gomila *et al.* 2007). Par exemple, les espèces *M. chelonae*, *M. massiliense*, *M. abscessus* et *M. bolletii* présentent les mêmes séquences du gène *rrs*, tout comme les espèces *M. houstonense*, *M. farcinogenes*, *M. senegalense* et *M. conceptionense*, les espèces *M. peregrinum* et *M. septicum*, les espèces *M. neworleansense* et *M. porcinum*, ou les espèces *M. mucogenicum* et *M. phocaicum* (Gomila *et al.* 2007). D'après une autre étude, le séquençage de la quasi-totalité du gène référence codant l'ARNr 16S, via le couple d'amorce fD1/rP2 (Weiss *et al.* 2001 ; Adékambi et Drancourt 2004), qui est équivalent à quelques bases près à la région encadrée par les amorces 8FPL/1492 (Turenne *et al.* 2001 ; Cook *et al.* 2003), ne permet pas de différencier certaines espèces de NTM à croissance rapide (Adékambi et Drancourt 2004). Par exemple, les espèces *M. houstonense* ; *M. farcinogenes* et *M. senegalense* présentent les mêmes séquences du gène *rrs*, et les espèces *M. chelonae* et *M. abscessus* sont difficilement dissociables (Adékambi et Drancourt 2004). Tout comme ces espèces de NTM à croissance rapide, les espèces à croissance lente *M. kansasii* et *M. gastri* ne semblent pas être distinguables par séquençage du gène *rrs* (Kim *et al.* 1999; Blackwood *et al.* 2000).

- **Le séquençage partiel des gènes *gyrA* et *gyrB***

Le séquençage partiel des gènes *gyrA* et *gyrB*, mesurant respectivement 2519 pb et 2034 pb, et codant la gyrase impliquée dans l'enroulement et le déroulement de l'hélice d'ADN (positions respectives 7302 à 9821 et 5257 à 7290 sur le chromosome de *M. avium* 104 Gene Bank NC_008595), est utilisé pour déterminer la résistance des mycobactéries aux quinolones (Guillemin *et al.* 1995; Guillemin *et al.* 1998; Dauendorffer *et al.* 2003). Le séquençage partiel de ces régions, présentes dans *gyrA* et *gyrB* (respectivement 216 pb et 321 pb), passe par l'utilisation respective des amorces Pri9/Pri8 et GyrbA/GyrbE (Figure 6). Le séquençage partiel de *gyrB*, via les amorces GyrbA/GyrbE (321 pb), semble être plus discriminant que le séquençage de référence du gène *rrs*. Effectivement entre des espèces de NTM à croissance rapide, le degré de similarité du séquençage de cette région du gène *gyrB* est inférieur au degré de similarité du séquençage de la quasi-totalité du gène *rrs*. Le polymorphisme plus importante de cette région de *gyrB*, par rapport au gène *rrs*, confère à cette dernière un intérêt complémentaire pour l'identification des mycobactéries par séquençage (Gomila *et al.* 2007).

- **Le séquençage partiel du gène *hsp65***

Le gène *hsp65*, codant une protéine de résistance au choc thermique de 65 kDa et mesurant 1625 pb (position 4835762 à 4837387 sur le chromosome de *M. avium* 104 Gene Bank NC_008595), peut être utilisé pour identifier les mycobactéries par séquençage via les amorces MACHspF_574/ MACHsp65R (Figure 6). En particulier, une région de 1058 pb du côté 3' du gène est très polymorphe et conservée chez les mycobactéries. Les amorces

MACHspF_574/MACHsp65R sont utilisées pour identifier les espèces du MAC par séquençage de cette partie 3' du gène *hsp65* (Turenne *et al.* 2006). La région 5' du gène *hsp65*, ciblée par les amorces Tb11 et Tb12, a souvent été utilisée pour distinguer par séquençage les espèces du MAC (Swanson *et al.* 1997) ou les autres espèces de NTM (McNabb *et al.* 2004), ainsi que pour des applications d'identification en PCR-REA et RFLP (Telenti *et al.* 1993 ; Domenech *et al.* 1997 ; Smole *et al.* 2002 ; Oliveira *et al.* 2003 ; Cheunoy *et al.* 2005 ; Bannalikal et Verma 2006 ; Prammananan *et al.* 2006 ; Yzquierdo *et al.* 2007). Initialement cette région a été proposée pour identifier les espèces de mycobactéries par PCR-REA (Telenti *et al.* 1993), car cette région contient des sites polymorphes caractéristiques de certaines espèces clivables par les enzymes de restriction *BstEII* et *HaeIII*. Afin d'améliorer le séquençage de cette région, certains auteurs amplifient par PCR une région légèrement plus grande via les amorces 21M13F/M13R, et utilisent les amorces Tb11/Tb12 pour le séquençage (Ringuet *et al.* 1999 ; Adékambi et Drancourt 2004). Cette région de *hsp65* a été étendue via le couple d'amorce HSPF3/HSPR4 (Kim *et al.* 2007) et est utilisée actuellement en seconde intention pour identifier les mycobactéries par MLSA au centre national de référence des mycobactéries de la Pitié-Salpêtrière. Initialement, la région côté 5' du gène *hsp65*, encadrée par les amorces Tb11/Tb12, a été proposée pour distinguer par séquençage les NTM à croissance rapide et notamment les espèces *M. chelonae* et *M. abscessus*, qui sont difficilement différenciables par séquençage de la quasi-totalité du gène *rrs* (Ringuet *et al.* 1999). Effectivement, concernant les NTM à croissance rapide, le séquençage du côté 5' de *hsp65* via les amorces Tb11/Tb12, permet de distinguer les espèces *M. chelonae* et *M. immunogenum*, des espèces *M. abscessus*, *M. bolletii*, et *M. massiliense*, alors que le séquençage de la quasi-totalité du gène *rrs* ne le permet pas (Gomila *et al.* 2007). Malgré une valeur de bootstrap non significative d'embranchement du dendrogramme, une autre étude menée aussi sur des NTM à croissance rapide, séquençant la même région du gène *hsp65*, indique que le séquençage de cette dernière permet de différencier *M. chelonae*, *M. abscessus* et *M. immunogenum* (Adékambi et Drancourt 2004). De plus, cette même étude indique que le séquençage de cette région du gène *hsp65* permet de différencier l'espèce *M. houstonense* des espèces *M. farcinogenes* et *M. senegalense*, contrairement au séquençage de la quasi-totalité du gène *rrs* qui lui ne le peut pas (Adékambi et Drancourt 2004). Néanmoins, en raison des valeurs faibles de bootstraps d'embranchement du dendrogramme, le séquençage de *hsp65* semble, dans cette étude, moins robuste que le séquençage du gène *rrs* pour identifier les NTM à croissance rapide (Adékambi et Drancourt 2004).

- **Le séquençage partiel du gène *recA***

Le séquençage du gène *recA* mesurant au total 1053 pb (position 3757622 à 3758674 sur le chromosome de *M. avium* 104 Gene Bank NC_008595) et codant une protéine bifonctionnelle d'activité d'échange de brins d'ADN et d'activité protéolytique durant la recombinaison homologue, peut être séquencé du côté 3' en sa quasi-totalité (Figure 6) via les couples d'amorces *recR1/recF2* et *recR2/recG1* (Blackwood *et al.* 2000) ou le couple d'amorces *recR2/recF3* (Gomila *et al.* 2007). Un séquençage total a aussi été proposé en utilisant les amorces *recR1/recF2b*, *recR2/recG1* et les amorces *rec3288F/rec3575R* permettent de séquencer le côté 5' (Adékambi et Drancourt 2004). Le séquençage quasi-total du gène *recA*, via les amorces *recR2/recG1* et *recR1/recF2*, a été proposé comme un complément d'analyse à l'identification des mycobactéries par séquençage du gène *rrs*. En effet, le degré de similarité inter-espèces du séquençage du gène *recA* est plus bas que celui du séquençage du gène *rrs*, à l'exception des espèces du MTC. Le séquençage quasi-total de *recA* permet, par exemple, de différencier *M. kansasii* et *M. gastri*, contrairement au séquençage du gène *rrs* (Blackwood *et al.* 2000). Concernant les mycobactéries à croissance rapide *M. chelonae*, *M. massiliense*, *M. abscessus*, *M. bolletii* et *M. immunogenum*, le séquençage partiel du gène *recA*, via les amorces *recR2/recF3*, combiné au séquençage partiel de *hsp65*, via les amorces Tb11/Tb12, semble plus discriminant que le séquençage total du

gène *rrs* (Gomila *et al.* 2007). Il est à noter que contrairement aux autres gènes de ménage (gène commun aux organismes vivants), le gène *recA* présente de nombreuses zones de substitution entre les espèces de mycobactéries à croissance rapide (Gomila *et al.* 2007). Toujours concernant les mycobactéries à croissance rapide, le séquençage de la totalité du gène *rrs* est très comparable au séquençage total du gène *recA*. Effectivement, les valeurs des bootstraps d'embranchement des dendrogrammes dans cette étude sont importantes, les regroupements phylogénétiques des espèces de mycobactéries à croissance lente sont similaires et les espèces *M. senegalense*, *M. farcinogenes* et *M. houstonense* ne peuvent être différenciées par séquençage des gènes *rrs* et *recA* (Adékambi et Drancourt 2004).

- **Le séquençage partiel du gène *rpoB***

Le gène *rpoB*, mesurant au total 3435 pb (position 4631379 à 4634813 sur le chromosome de *M. avium* 104 Gene Bank NC_008595) et codant la sous-unité β de l'ARN polymérase, peut être séquencé partiellement du côté 3' (Figure 6), via le couple d'amorces MF/MR (Kim *et al.* 1999). Les mutations de cette région permettent en plus d'apprécier la résistance de *M. tuberculosis* à la rifampicine (Ozkutuk *et al.* 2007 ; Rigouts *et al.* 2007 ; Soudani *et al.* 2007). Cette région correspond à quelques bases près à la région du couple d'amorces RGMF/RGMR (Kim *et al.* 2007), qui est utilisée actuellement en troisième intention pour identifier par séquençage les mycobactéries au centre national de référence des mycobactéries de la Pitié-Salpêtrière, tout en conservant l'appréciation de la résistance à la rifampicine. Le séquençage de la région la plus variable du gène *rpoB*, via les amorces MycoF/MycoR et MycoseqF/MycoseqR, est utilisable pour distinguer les mycobactéries à croissance lente d'origine clinique. Cette méthode consiste à amplifier par PCR une région d'environ 750 pb via les amorces MycoF/MycoR pour améliorer le séquençage d'une région plus petite de 730 pb via les amorces MycoseqF/MycoseqR (Adékambi *et al.* 2003 ; Gomila *et al.* 2007). Le séquençage de la totalité de *rpoB* peut, par ailleurs, être réalisé par les amorces Smeg7F/Smeg601R, Smeg529F/Smeg1485R, MF/Smeg2003R, Smeg1698F/Smeg2649R, Smeg2426F/Smeg3288R, Smeg2835F/Smeg3668R et Smeg3558F/Smeg4260R (Kim *et al.* 1999 ; Adékambi *et al.* 2003 ; Adékambi et Drancourt 2004). Le séquençage total de *rpoB* a été proposé comme un complément d'analyse à l'identification des mycobactéries par séquençage du gène *rrs* (Adékambi et Drancourt 2004). Dans cette étude, le séquençage de la totalité de *rpoB* semble tout aussi discriminant et robuste que le séquençage total du gène *rrs*. Effectivement, les valeurs des bootstraps d'embranchement des dendrogramme de ces deux méthodes d'analyse du séquençage sont importantes (Adékambi et Drancourt 2004). Concernant le séquençage partiel de *rpoB* via le couple d'amorces MF/MR, ce dernier peut distinguer *M. kansasii* et *M. gastri*, alors que cela n'est pas possible par le séquençage total du gène *rrs* (Kim *et al.* 1999). La région hypervariable de *rpoB* proposée pour identifier les NTM à croissance rapide, via les amorces MycoF/MycoR et MycoseqF/MycoseqR (Adékambi *et al.* 2003), semble ne pas apporter de pouvoir de discrimination additionnelle au séquençage de la quasi-totalité du gène *rrs* (Gomila *et al.* 2007).

- **Le séquençage partiel gène *sodA***

Le séquençage du gène *sodA* mesurant au total 623 pb (position 175683 à 176306 sur le chromosome de *M. avium* 104 Gene Bank NC_008595), codant la sous-unité A de la superoxyde dismutase, est considéré comme une région très polymorphe. Le séquençage d'une région d'environ 460 pb, via les amorces SodF/SodR (Figure 6), a été proposé initialement (Bull *et al.* 1995) pour identifier par séquençage les NTM isolées de patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise et a été utilisé pour décrire une nouvelle espèce : *M. mageritens* (Domenech *et al.* 1997). Cette région a été reprise pour étudier l'identification des mycobactéries à croissance rapide par séquençage partiel côté 3'. Cette méthode consiste à amplifier par PCR une région d'environ 540 pb via les amorces

SodlgF/SodlgR pour améliorer la qualité du séquençage de la région plus petite encadrée par les amorces SodF/SodR (Adékambi et Drancourt 2004). Plus récemment dans un objectif d'identification des NTM à croissance rapide, le séquençage de la quasi-totalité de *sodA* côté 5' a été effectué via les amorces Z205F/Z212R (Gomila *et al.* 2007), qui sont d'ailleurs équivalentes aux amorces universelles Z205/Z212 (Zolg et Philippi-Schulz 1994). Tout comme le séquençage total du gène *rrs*, le séquençage quasi-total du gène *sodA* via les amorces Z205F/Z212R, n'est pas assez discriminant pour différencier les espèces *M. chelonae*, *M. massiliense*, *M. abscessus* et *M. bolletii* ou les espèces *M. mucogenicum* et *M. phocaicum*. Néanmoins concernant le groupe V de Runyon constitué de NTM à croissance rapide, le pouvoir de discrimination du séquençage de cette région de *sodA*, semble plus important que celui du séquençage du gène *rrs* (Gomila *et al.* 2007). Tout comme le séquençage total du gène *rrs*, une autre étude menée aussi sur des NTM à croissance rapide et séquençant *sodA*, via les amorces SodF/SodR et SodlgF/SodlgR, indique que le séquençage de ce gène permet de différencier *M. mageritense* du groupe formé par *M. houstonense*, *M. senegalense* et *M. farcinogenes*, mais avec une analyse de séquence présentant des valeurs de bootstraps d'embranchement du dendrogramme plus faibles que celles de l'analyse du séquençage du gène *rrs* (Adékambi et Drancourt 2004).

II.2.e / L'analyse phylogénique

L'identification des mycobactéries par MLSA requière une analyse phylogénique pour comparer les séquençages à identifier à des séquences de bases de données. Concernant l'identification des mycobactéries, il est possible d'utiliser la base de données Genbank du NCBI aux USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), la base d'identification bactérienne par bioinformatique en France (bioinformatic bacteria identification : BIBI) (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>), ou la base publique RIDOM en Allemagne (<http://www.ridom-rdna.de>). Bien qu'il n'existe aucun consensus ni sur le logiciel d'analyse phylogénétique, ni sur la méthode d'alignement (CLUSTAL X ou W), l'identification des mycobactéries par séquençage est généralement réalisée en utilisant les modèles de calcul de distances de Jukes-Cantor (Jukes-Cantor distance: JC) ou de paramètre 2 de Kimura (Kimura's Two-parameter: K₂P), et la matrice de jonction de voisinage (neighbor-joining: NJ) (Saitou et Nei 1987) avec 1000 itérations de calcul pour le branchement des arbres phylogénétiques (Felsenstein 1985). Dans le cas des mycobactéries, et en regard de la littérature (Bull *et al.* 1995 ; Guillemin *et al.* 1995 ; Ninet *et al.* 1996 ; Domenech *et al.* 1997 ; Swanson *et al.* 1997 ; Kim *et al.* 1999 ; Ringuet *et al.* 1999 ; Blackwood *et al.* 2000 ; Cloud *et al.* 2002 ; Turenne *et al.* 2002 ; Adékambi *et al.* 2003 ; Adékambi et Drancourt 2004 ; McNabb *et al.* 2004 ; Adékambi *et al.* 2006b ; Turenne *et al.* 2006 ; Gomila *et al.* 2007 ; Kim *et al.* 2007), le choix de la méthode de calcul de distance réside donc uniquement sur la prise en compte du poids des transversions nucléotidiques (probabilité que les bases puriques et pyrimidiques deviennent respectivement les bases puriques et pyrimidiques complémentaires), qui est double dans le modèle K₂P (Kimura 1980) par rapport au modèle JC (Jukes et Cantor 1969). Les méthodes de parcimonie, basées non pas sur des matrices de divergence mais sur des matrices de caractères discrets, ne sont aujourd'hui plus utilisées pour l'analyse phylogénique des mycobactéries.

II.3 / La caractérisation

II.3.a / A partir d'un isolement

Dans des objectifs d'identification de souches virulentes, de description de la structure des populations, d'identification des forces de sélection de ces populations et de détermination de sources de ces dernières, de nombreuses méthodes sont applicables à des isollements mycobactériens. L'ensemble de ces méthodes de caractérisation a fait récemment l'objet d'une synthèse en fonction des espèces de NTM caractérisables (Behr et Falkinham 2009). En plus du séquençage multi-locus permettant de caractériser l'ensemble des espèces

de NTM, il existe des méthodes de caractérisations par sérotypage, biotypage, électrophorèse multi-locus d'enzymes (multi-locus enzyme electrophoresis: MLEE), caractérisation de plasmides, typage des séquences répétées (repetitive sequence typing: rep-PCR), typage par amorces PCR arbitraires (arbitrary primed PCR: AP-PCR), électrophorèse en champs pulsés (pulsed field gel electrophoresis: PFGE) et caractérisation des séquences d'insertion, applicables au MAC ainsi qu'aux NTM à croissance lente *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, et à croissance rapide *M. fortuitum*, *M. abscessus* et *M. chelonae* (Behr et Falkinham 2009). Ces méthodes peuvent être comparées via la diversité allélique (Nei 1978) ou l'indice de discrimination (Hunter et Gaston 1988), représentant respectivement la probabilité pour un locus de présenter plusieurs allèles et la probabilité de distinguer des souches de profils différents (Figure 7).

$$h = 1 - \sum_{i=1}^S x_i^2 \left[\frac{n_i(n_i - 1)}{n_i} \right] \quad DI = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1) \right]$$

Figure 7 : Formule de calcul de l'indice de discrimination (DI) et de la diversité allélique (h), N : nombre total de souches, S : nombre total de profils distinct, n_j : nombre de souches du j^{ème} profil, n_i : nombre de souches du i^{ème} allèle, x_i : fréquence des souches du x_i^{ème} allèle (Nei 1978 ; Hunter et Gaston 1988)

Effectivement ces méthodes de caractérisation présentent des pouvoirs de discrimination très variables allant de 0,29 pour la MLEE à 0,99 pour la PFGE et la RFLP (Tableau 10).

Tableau 10 : Indice de discrimination (DI) des méthodes de caractérisation du complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (données reprises (Behr et Falkinham 2009))

Méthode de caractérisation	Proportion de souches	Nombre de groupe	DI
Sérotypage	77-87	8-25	0,83-0,95
Biotypage	100	8	0,80
MLEE	100	23-58	0,29-0,38
Plasmide	72-82	4	0,76
rep-PCR	100	23	0,96
AP-PCR	100	98	0,99
PFGE	80-100	38-39	0,94-0,99
RFLP-IS1245	100	9-89	0,95-0,99

MLEE : multi-locus enzyme electrophoresis, rep-PCR : repetitive sequence typing, AP-PCR : arbitrary primed PCR, PFGE ; pulsed field gel electrophoresis, RFLP: restriction fragment length polymorphism, IS^o: insertion sequence.

N'ayant pas été développées pour être spécifiques de chacune des espèces caractérisables, ces méthodes de caractérisation sont applicables à des souches isolées et ne peuvent donc pas être appliquées à des échantillons cliniques ou environnementaux. De plus, ces méthodes de caractérisation ne permettent pas de caractériser toutes les espèces de NTM et sont donc actuellement restreintes aux espèces de NTM *M. abscessus*, MAC, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. ulcerans* et *M. xenopi* (Tableau 11). Par ailleurs, le spoligotypage est aussi à noter comme méthode de caractérisation d'isolats mycobactériens. Néanmoins, cette méthode de caractérisation du polymorphisme des espaceurs, qui sont encadrés par des séquences d'ADN identiques nommées répétitions directes (direct repeats: DR), n'a pour le moment été développée que pour les espèces du MTC *M. tuberculosis* (Soini *et al.* 2000 ; Sola *et al.* 2001) et *M. bovis* (Rodríguez *et al.* 2010).

Tableau 11 : Méthodes de caractérisation applicables à quelques espèces de mycobactéries non-tuberculeuses à l'exception du séquençage multi-locus applicable à l'ensemble des espèces (données synthétisées (Behr et Falkinham 2009))

Espèces	Méthode de caractérisation							
	Sérotypage	Biotypage	MLEE	Plasmide	rep-PCR	AP-PCR	PFGE	RFLP
<i>abscessus</i>						✓	✓	
<i>avium-intracellulare</i>	✓	✓	✓	✓	MIRU	✓	✓	IS1245 ou IS900
<i>chelonae</i>							✓	
<i>fortuitum</i>							✓	
<i>haemophilum</i>								
<i>kansasii</i>					MPTR	✓	✓	IS1652 ou ARNr 16S
<i>malmoense</i>						✓	✓	ARNr 16S ou 23S
<i>ulcerans</i>				pTBN12				✓
<i>xenopi</i>								IS1395

MLEE: multi-locus enzyme electrophoresis, rep-PCR: repetitive sequence typing, AP-PCR: arbitrary primed PCR, PFGE: pulsed field gel electrophoresis, RFLP: restriction fragment length polymorphism, IS: insertion sequence, MPTR: major polymorphic tandem repeat, MIRU: mycobacterial interspersed repetitive units.

II.3.b / A partir d'un échantillon complexe

Les méthodes appliquées pour l'étude des communautés bactériennes permettent d'obtenir des profils basés sur la séparation des fragments amplifiés en fonction de leur composition en bases G-C, comme l'électrophorèse de gel en gradient dénaturant (denaturing gradient gel electrophoresis : DGGE), l'électrophorèse de gel en gradient de température (temperature gradient gel electrophoresis: TGGE), l'électrophorèse de gel en gradient temporel de température (temporal temperature gradient gel electrophoresis: TTGE), le polymorphisme de conformation de simple brin (single-strand conformation polymorphism: SSCP), la chromatographie liquide de haute performance dénaturante (denaturing high performance liquid chromatography: dHPLC) ou en fonction de leur taille, comme l'analyse de l'espace intergénique ribosomal (automated ribosomal intergenic spacer analysis: ARISA), et le polymorphisme de longs fragments de restriction terminaux (terminal restriction fragment length polymorphism: tRFLP). Ces méthodes, ciblant la plupart du temps l'ARNr 16S ou l'ITS, ont été développées pour caractériser les communautés de bactéries et d'archées, et sont donc utilisables pour caractériser les assemblages (ou peuplements) de NTM. Néanmoins, seulement quelques études utilisant la DGGE sont à noter concernant l'application aux NTM de ces méthodes de caractérisation des assemblages bactériens. Effectivement, les méthodes de caractérisation des assemblages de mycobactéries sont beaucoup moins décrites que les méthodes de caractérisation de NTM isolées par bactériologie. Ces méthodes ont pour but de reproduire une image de la structure globale et de la richesse taxonomique de la communauté ou de l'assemblage microbien et non pas d'identifier les espèces individuelles ou gènes de la communauté (Mills *et al.* 2003). De plus ces méthodes ne permettent de détecter que les taxons représentant plus de 4 % de la population ciblée (Muyer *et al.* 1993). Toutefois il est possible de séquencer les fragments séparés par électrophorèse ou dHPLC afin d'identifier certains fragments dans le profil généré.

Par exemple dans une étude ciblant le gène *rrs* et étudiant la composition des NTM dans l'eau de réseau de distribution, les fragments de gènes *rrs* séparés par DGGE ont pu être séquencés (Pryor *et al.* 2004). Une étude a proposé d'étudier spécifiquement la composition des communautés de NTM dans les sols par DGGE en utilisant une amorce PCR sens Fmyco987, qui serait spécifique du genre *Mycobacterium*, et une amorce anti-sens Rmyco1378, qui serait spécifique des *Actinobacteria* (Niva *et al.* 2006). L'amorce Rmyco1378 ciblant l'ARNr 16S, a, par la suite, été réutilisée pour développer une méthode de quantification des NTM dans les sols par une méthode d'hybridation sandwich (Nieminen *et al.* 2006). Une seconde étude a proposé quant à elle d'étudier les communautés de NTM à

croissance rapide dans les sols par DGGE en utilisant une amorce PCR sens MYCO66f, qui serait spécifique des *Actinobacteria*, et une amorce anti-sens MYCO600r, qui serait spécifique des NTM à croissance rapide (Leys *et al.* 2005). Par la suite cette méthode ciblant l'ARNr 16S a été ré-utilisée à plusieurs reprises dans le même objectif pour l'étude des communautés de NTM à croissance rapide des sols, en particulier des sols pollués en PAH (Uyttebroek *et al.* 2006 ; Uyttebroek *et al.* 2007a ; Uyttebroek *et al.* 2007b). Sans application aux NTM déjà publiées, le pyroséquençage est une méthode de séquençage à haut débit permettant de caractériser la majorité des séquences d'un échantillon. Cette méthode a d'ailleurs été proposée pour comparer les sources des bactéries fécales dans les bassins versants (Unno *et al.* 2010). Néanmoins, cette dernière reste très coûteuse et dépendante de la méthode d'extraction d'ADN utilisée et, sans doute, surdimensionnée pour l'étude d'assemblages composés d'un seul genre comme *Mycobacterium*.

II.4 / Conclusion et perspectives

En conclusion sur les outils analytiques applicables aux matrices environnementales, l'adaptation des techniques développées en milieu médical est un véritable défi. Concernant l'application de ces méthodes à l'étude des NTM dans l'environnement, l'harmonisation des méthodes de bactériologie, ainsi que la comparaison de la spécificité et de la sensibilité des cibles moléculaires, semblent être les points essentiels à développer. En perspective, bien que ne présentant que peu de recul sur leur intérêt, la GC-MS (Minnikin *et al.* 2010), le pyroséquençage (Unno *et al.* 2010) et la technologie Luminex (Griffith *et al.* 2009) semblent être des outils de détection et caractérisation prometteurs complémentaires de la PCR en temps réel et des alternatives aux méthodes usuellement utilisées comme la PCR conventionnelle (Tableau 9).

III / Les sources de microorganismes pathogènes dans les bassins versant

En regard des caractéristiques des NTM (chapitre I §I /) expliquant les connaissances actuelles de leur épidémiologie (chapitre I §I.2 /) et de leur écologie (chapitre I §I.3 /), certaines méthodes décrites précédemment peuvent être appliquées pour rechercher les NTM dans l'environnement (chapitre I §II /), notamment les sources dans les bassins versants. Il existe de nombreux pathogènes pour l'homme dans les bassins versants, incluant des virus (Castignolles *et al.* 1998 ; Pina *et al.* 1998 ; Jiang *et al.* 2001), des parasites (Ongerth et Stibb 1987 ; Hansen et Ongerth 1991 ; Xiao *et al.* 2001 ; Ahmed *et al.* 2008 ; Lucy *et al.* 2008 ; Mons *et al.* 2009 ; Moulin *et al.* 2010), ou des bactéries (Bolton *et al.* 1987 ; Araujo *et al.* 1991 ; Sugita *et al.* 1995 ; Pettibone 1998 ; Berekaa et Steinbüchel 2000 ; Gonï-Urriza *et al.* 2000 ; Solo-Gabrielle *et al.* 2000 ; McLellan 2004 ; Whan *et al.* 2005 ; Lyautey *et al.* 2007 ; Ahmed *et al.* 2008), qui ont leurs propres caractéristiques et modes de vie dans l'environnement. De nombreuses études ont donc pour but de rechercher les sources et réservoirs de ces pathogènes afin de prévenir les épidémies et de gérer la ressource en eau. Parmi les pathogènes bactériens, les NTM ont reçu peu d'intérêt jusqu'à présent, bien que les mycobactérioses soient souvent d'origine hydrique. Ce chapitre se propose donc de définir les sources probables de NTM au regard de leurs comportements (I.3 /) et en fonction des données existantes sur d'autres bactéries pathogènes émergentes dans l'environnement. Effectivement, les rejets urbains et ruraux tels que les rejets ponctuels de station d'épuration (waste water treatment plant: WWTP), les stations de dépollution des eaux de pluviales (rain water treatment plant: RWTP), de bassins de stockage des eaux pluviales, de déversoirs d'orage, ainsi que les rejets diffus des eaux de ruissellement, peuvent être des sources majeures d'apport de différents microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme dans l'environnement.

III.1 / Les rejets ponctuels

Les rejets ponctuels des WWTP et des RWTP correspondent à l'impact de rejets traités ou non sur le milieu récepteur. En pratique, le rejet de la station et la qualité du milieu récepteur sont uniquement considérés, et le flux de pollution admissible correspond à la différence entre le flux de pollution maximal compatible avec l'objectif du bon état du milieu et le flux de pollution du milieu à l'amont du rejet. A titre d'exemple, sur le bassin de la Seine, fortement anthropisé (Meybeck *et al.* 1998), l'agglomération parisienne (10 millions d'habitants), à elle seule, possède cinq stations d'épuration, à savoir Seine Aval, Seine Amont, Seine Centre, Seine Grésillons, et Marne aval, qui ont des capacités de traitement journalières de 1 700 000 m³, 600 000 m³, 240 000 m³, 100 000 m³, et de 75 000 m³ respectivement (<http://www.siaap.fr/>). Ainsi, le débit instantané moyen de la plus grande WWTP de ce bassin versant passe d'environ 20 m³/s en temps sec à 40 m³/s en temps de pluie pour environ cinq événements dans l'année (Billen *et al.* 2007 ; Even *et al.* 2007). Tout comme la contamination bactérienne et la contamination parasitaire, il n'existe pas de données conséquentes sur les rejets de RWTP concernant les villes pourvues de systèmes séparatifs des eaux usées et des eaux de pluies. Néanmoins une étude récente indique que les microorganismes pathogènes ont été identifiés comme les risques majeurs pour la santé humaine associée à la réutilisation des eaux de pluies urbaines provenant du ruissellement sur des zones pavées ou non (Davies *et al.* 2008).

III.1.a / Les bactéries pathogènes émergentes

Les pathogènes émergents d'origines hydrique constituent une menace majeure pour la santé publique à la fois dans les pays développés et en voie de développement. Ainsi l'émergence rapide de *Vibrio cholerae* O139, *E. coli* O157:H7 et de *Cryptosporidium* résistantes au chlore ces dernières années a pris une ampleur internationale. D'autres organismes comme les virus de l'hépatite, *Campylobacter jejuni*, *Microsporidium*, *Cyclospora*, *Yersinia enterocolitica*, les calicivirus et les bactéries environnementales telles que les mycobactéries, les aéromonades, *Legionella pneumophila* et les souches de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistantes ont été récemment associées avec des maladies d'origine hydrique (Sharma *et al.* 2003). La globalisation des échanges commerciaux, les changements de démographie, et les changements de technologie de traitement des eaux potables et résiduaires ont constitué les facteurs prédominants dans l'émergence où la ré-émergence de ces nouveaux pathogènes (Nwachuku et Gerba 2004).

Les WWTP peuvent être la cause de rejets de bactéries dans l'environnement. Par exemple, dans la rivière Hikiji au Japon, il a été démontré que les *Aeromonas* sont des microorganismes aquatiques majeurs, présents dans les eaux de rivières, dans leurs sédiments et dans le tractus digestif des poissons (Sugita *et al.* 1995). En Espagne, l'espèce *A. caviae* prédomine dans les eaux de rejets urbains riches en flores fécales à Soria et Barcelone, et les espèces *A. hydrophila* et *A. sobria* prédominent dans les eaux naturelles. Paradoxalement à leur sur-représentativité dans les eaux pauvres en indicateurs de contamination fécale, les espèces *A. hydrophila* et *A. sobria* semblent présenter plus de facteurs de virulence que l'espèce *A. caviae* (Araujo *et al.* 1991). En Espagne, il a été observé que les rejets d'eaux usées de la ville de Pampelune, dans la rivière Arga, provoquaient l'apparition d'*Enterobacteriaceae* et d'*Aeromonas* plus résistantes aux quinolones que celles naturellement présentes dans le cours d'eau. Les échanges génétiques entre ces deux populations étant limités, cette résistance aux quinolones aurait été induite par un rejet massif d'antibiotiques en amont du point de rejet (Goni-Urriza *et al.* 2000). Concernant, les *Enterobacteriaceae*, une étude dans le Wisconsin aux USA entre 2000 et 2003 sur des *E. coli* isolées des eaux de surface, est arrivée à la conclusion que cette espèce indicatrice de contamination fécale, potentiellement pathogène pour l'homme, provenait principalement des rejets urbains et dans une moindre mesure des eaux de ruissellement. Effectivement, les souches isolées présentant un profil génétique similaire aux souches isolées des eaux de

surface étaient 20 % plus nombreuses dans les rejets urbains que dans les eaux de ruissellement (McLellan 2004). Par ailleurs, en Angleterre, la quantification de *Campylobacter* dans les fleuves Ribble, Calder et Hodder, fut plus importante et fréquente pour des zones situées en aval de WWTP que pour des zones rurales. Les sérotypes de *C. jejuni*, fréquemment isolés dans ces fleuves, se sont avérés être les sérotypes majoritairement responsables de gastroentérites en Angleterre pendant la durée de cette étude (Bolton *et al.* 1987).

D'autre part, une étude en Australie sur la présence de microorganismes pathogènes dans les citernes de récupération d'eau de pluie indique que les indicateurs de contamination fécale *E. coli*, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, et *Bacteroides* pouvaient être isolés des échantillons d'eaux et que des gènes de pathogènes tels que *Campylobacter coli*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, et *Salmonella* pouvaient y être détectés (Ahmed *et al.* 2008). Les citernes de récupération d'eau de pluie peuvent donc aussi être considérées comme des sources ponctuelles de rejets de bactéries pathogènes pour l'homme dans l'environnement. De plus, cette étude conclut que la faible corrélation entre la présence de microorganismes pathogènes et la présence des indicateurs de contamination fécale dans l'eau de pluie récupérée ne permet pas d'utiliser ce critère comme indicateur fiable de la qualité sanitaire de ce type d'eau (Ahmed *et al.* 2008).

III.1.b / Le cas des mycobactéries

Concernant les mycobactéries, peu d'études se sont intéressées aux rejets de WWTP (chapitre I§I.3.b /). Par exemple, les espèces *M. fortuitum* et *M. ratisonense* ont déjà été isolées dans des boues activées en Allemagne (Berekaa et Steinbüchel 2000), ainsi que l'espèce *M. avium* ssp. *paratuberculosis* en Irlande dans des eaux usées en entrée de WWTP (Whan *et al.* 2005). Cette dernière étude signale que la présence de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* dans les eaux usées correspondait à des valeurs hautes de pH (7,5-8,2), et conclut sur la nécessité d'un traitement efficace des WWTP vis-à-vis de cette espèce pathogène pour limiter tout risque d'infections par contact avec cette eau à usage récréatif dont la nature pourrait être impactée par les rejets de la station d'épuration concernée (Whan *et al.* 2005). Cette étude n'a pas observé de corrélation significative entre la prévalence de MAP en entrée de station et la saison, ni entre cette quantité de MAP et la quantité de coliformes fécaux, mais elle souligne néanmoins que la prévalence de MAP était plus élevée au printemps (Whan *et al.* 2005). Quant aux citernes de récupération d'eau de pluie qui sont très peu étudiées, aucune donnée n'indique la présence de NTM dans ce type d'ouvrage.

III.2 / Les rejets diffus

Les rejets ponctuels étant de plus en plus maîtrisés, la recherche se focalise à présent sur les rejets diffus, c'est-à-dire sur les rejets ou pollutions dont la source n'est pas clairement identifiée. Pendant les épisodes pluvieux, les rejets diffus correspondent à l'impact sur le milieu récepteur des ruissellements qui ne sont pas pris en charge par les WWTP (eau de ruissellement entrant dans les réseaux unitaires), ou les RWTP (eau de ruissellement entrant dans les réseaux séparatifs d'eau pluviale). A titre indicatif, le bassin versant de la Seine présente des conditions hydrologiques très contrastées. Par exemple, le débit moyen de la Seine à Paris a été estimé à 214 m³/s pendant les années sèches comme 1996 et 526 m³/s pendant les années pluvieuses comme 2001, soit en moyenne 354 m³/s entre 1986 et 1996 (Billen *et al.* 2007 ; Even *et al.* 2007). Les rejets diffus ainsi que les rejets ponctuels peuvent donc générer une très forte augmentation du débit de la Seine.

III.2.a / Les bactéries pathogènes émergentes

L'étude sur le fleuve Buffalo dans le Minnesota, entre 1992 et 1993, indique que durant les événements pluvieux estivaux le taux d'*Aeromonas* augmente de 1 log dans tout le bassin versant, alors qu'il ne fait que doubler dans les sites en amont (Pettibone 1998). Cette observation pourrait traduire l'influence des ruissellements qui charrieraient les *Aeromonas* de l'amont du bassin versant vers l'aval pendant les périodes pluviales. Concernant les *Enterobacteriaceae*, au cours d'une étude du fleuve New River dans le Norfolk en Floride, il a été démontré qu'il existe un apport en *E. coli* dans les eaux de surface lors des tempêtes et qu'après ces épisodes pluvieux le taux d'*E. coli* revenait à son niveau habituel (Solo-Gabrielle *et al.* 2000). Cet apport proviendrait du lessivage des sols par les eaux de ruissellement qui entraîneraient ces microorganismes jusqu'au fleuve via le bassin versant. Une autre bactérie pathogène pour l'homme, *Listeria monocytogenes*, a aussi été décrite dans des bassins versants. Effectivement, dans une étude entre juin et novembre 2005 sur la plus large rivière de l'Ontario au Canada, il a été observé une corrélation entre l'occurrence du pathogène humain et animal *Listeria monocytogenes* dans les eaux de surface, à l'aval immédiat de fermes d'élevage de vaches laitières, et le degré de champs défrichés. (Lyautey *et al.* 2007). Cette observation pourrait indiquer que ces terrains nus favorisent les transports de *L. monocytogenes* par ruissellement depuis les zones d'élevage jusqu'au milieu récepteur en aval de ces dernières.

III.2.b / Le cas des mycobactéries

Concernant les NTM, là encore, peu de données permettent d'apprécier la part que représentent les eaux de ruissellement des bassins versants. En effet, sans pour autant les mesurer directement, des études indiquent que les ruissellements sont des sources d'apport de NTM dans les eaux de surface. Par exemple, la présence des NTM dans les eaux de surface a été corrélée avec les données de pluviométrie à trois semaines (Iivanainen *et al.* 1993), et les ruissellements semblent entrainer dans les eaux de surface la sous-espèce MAP à partir des pâturages contaminés (Pickup *et al.* 2006). Effectivement, comme nous l'avons déjà mentionné (chapitre I§1.3.a /), certains sols, potentiellement érodables par temps de pluie, sont des habitats potentiels de mycobactéries, comme les sols riches en acides humiques et les sols pollués en PAH. Néanmoins, ces sols propices à la croissance des NTM n'ont jamais été comparés entre eux, tout comme leur composition physicochimique.

III.3 / Les variations saisonnières

Les rejets diffus sont indirectement liés à la variabilité saisonnière, qui est donc un facteur important à prendre en considération dans l'évaluation des risques que représentent les apports de microorganismes potentiellement pathogènes dans le milieu récepteur.

III.3.a / Les bactéries pathogènes émergentes

La variabilité des saisons conditionne les cycles de vie dans l'environnement des bactéries pathogènes pour l'homme. Par exemple, en Angleterre en 1986, la quantification des rejets urbains en *Campylobacter* dans l'eau des fleuves Ribble, Calder et Hodder, fut plus importante et fréquente en automne et en hiver qu'au printemps et en été (Bolton *et al.* 1987). Pour le fleuve Buffalo dans le Minnesota entre 1992 et 1993, contrairement aux périodes hivernales, les taux d'*Aeromonas* en amont du bassin versant ont été corrélés au taux de bactéries indicatrices (flore totale, coliformes fécaux et entérocoques intestinaux) pendant les périodes estivales, alors que dans le bassin versant les taux d'*Aeromonas* ont été corrélés aux taux de bactéries indicatrices pendant les périodes hivernales (Pettibone 1998). Il semblerait donc que les corrélations observées entre ces microorganismes en amont du bassin versant pendant l'hiver se retrouvent dans le bassin versant en été durant les périodes de précipitation. Ce déplacement pourrait correspondre à la concentration de ces microorganismes dans le bassin versant pendant les périodes pluvieuses commandées par les saisons. Concernant les

Enterobacteriaceae, l'étude du fleuve New River, dans le Norfolk en Floride, a montré qu'entre deux événements pluvieux le taux d'*E. coli* oscillait sinusoïdalement. Cette oscillation a été corrélée aux marées. Lorsque la marée était basse le taux d'*E. coli* était bas, et inversement le taux d'*E. coli* était haut pour les marées hautes. Le suivi de la quantité d'*E. coli* dans les sédiments des berges a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle durant les marées basses les *E. coli* se développaient dans les sols des berges asséchées et se retrouvaient dans la masse d'eau pendant les périodes de marées hautes qui lessivaient partiellement ces berges (Solo-Gabrielle *et al.* 2000). Dans une étude, entre juin et novembre 2005, sur les eaux de surface de la plus large rivière de l'Ontario au Canada, il s'est avéré que des combinaisons de profils génétiques et sérologiques de *Listeria monocytogenes* étaient principalement isolées en été et que d'autres profils étaient isolés en automne (Lyautey *et al.* 2007). Il semblerait donc, qu'au sein d'une même espèce bactérienne, des différences puissent exister dans les eaux de surface en relation avec la variabilité saisonnière.

III.3.b / Le cas des mycobactéries

Concernant les mycobactéries, une étude dans le Nord du Malawi indique que l'isolement de NTM dans les sols est beaucoup plus fréquente pendant les saisons sèches (tempérées de mai à octobre : 21°C et chaude de septembre à novembre : 24°C) que pendant les saisons humides (chaude de décembre à avril : 24°C). De plus, pendant les saisons humides, aucune mycobactérie ne fut détectée dans aucun échantillon d'eau de différentes origines (eau potable, eau de forage, eau de puits de maisons particulières) alors qu'en saison sèche 95 % des prélèvements d'eau furent positifs (Chilima *et al.* 2006). Sans préciser la période annuelle, la rare étude indiquant l'importance des ruissellements concernant le rejet de NTM dans le milieu récepteur (Iivanainen *et al.* 1993), souligne que les mois pluvieux sont les plus propices à la détection de NTM dans les eaux de surface. Sans rapport direct avec le ruissellement, l'étude sur les réseaux de distribution d'eau potable aux USA (Marciano-Cabral *et al.* 2010), et l'étude d'une station d'épuration en Irlande (Whan *et al.* 2005), soulignent effectivement que les mois pluvieux au printemps et en automne sont favorables à la détection de NTM et de MAP, respectivement. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à l'évaluation des rejets diffus de NTM à l'échelle de l'épisode pluvieux.

IV / Les objectifs de la thèse

La Directive-cadre sur l'eau (2000/60/CE) émet des objectifs de préservation et restauration de l'eau de surface et de l'eau souterraine d'ici 2015 en intégrant un objectif de « bon état chimique » et un objectif du « bon état écologique ».

IV.1 / La protection et la gestion de l'eau

L'objectif du « bon état chimique » de la Directive-cadre sur l'eau, est défini par une réduction de la concentration de 33 substances prioritaires à seuil réglementaire et par une élimination de 25 substances dangereuses prioritaires à seuil réglementaire. Ces seuils réglementaires apparaissent sous la nomination de normes de qualité environnementale. Ces molécules sont par exemple des métaux (Pb, Hg, Ni), des molécules appartenant aux familles des diphényléther bromés comme le pentabromodiphényléther ou l'éther de decabromodiphenyl (decabromodiphenyl ether: BDE) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques, ainsi que des composés chlorés ou phénolés.

L'objectif du « bon état écologique » de la Directive-cadre est quant-à lui défini par le suivi de la composition, de l'abondance de la biomasse du phytoplancton, des macrophytes, de la faune benthique invertébrée et de l'ichtyofaune. Ainsi, il est important de souligner que cette Directive-cadre sur l'eau présente des lacunes concernant le suivi des microorganismes pathogènes comme les NTM. Concernant les NTM, l'analyse bibliographique nous montre qu'il existe de nombreuses lacunes sur la connaissance des NTM, en particulier elle met en avant le manque d'outils d'analyse adéquats pour l'étude des mycobactéries dans

l'environnement. En découle une écologie très peu étudiée et par conséquent une faible connaissance des sources et réservoirs, de la dynamique et de la répartition spatio-temporelle des NTM dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. Les pathogènes humains peuvent résider et se développer dans des habitats non-hôtes, dans lesquels ils évoluent et se diversifient indépendamment de leur activité pathogénique (Morris *et al.* 2008). Ceci est d'autant plus vrai pour des pathogènes opportunistes comme les NTM. Cette constatation a conduit depuis longtemps aux pratiques d'assainissement de l'eau, de surveillance des populations d'animaux sauvages, de nettoyage et maintenance des systèmes de distribution d'eau et de ventilation, etc. Ces réflexions suggèrent que les pathogènes opportunistes comme les NTM sont capables de se disperser et de se développer dans de nouveaux environnements, cependant leurs cycles de vie dans les contextes non-médicaux sont encore largement ignorés. Ce manuscrit de thèse a donc pour but de mettre en place des outils et stratégies analytiques ainsi que des stratégies de prélèvement pour étudier les NTM en dehors de l'environnement clinique, tout en identifiant dans les bassins versants les compartiments qui semblent propices à la recherche de NTM.

IV.2 / La stratégie analytique

La hiérarchisation des sources d'un microorganisme dans un milieu d'étude donné nécessite la mise en œuvre d'outils analytiques de détection et/ou de quantification robustes et applicables aux échantillons étudiés. Concernant les NTM, l'état de l'art sur les outils analytiques applicables aux matrices environnementales (chapitre I §II /) nous indique que les méthodes de détection par microscopie (chapitre I §II.1.a /) ne permettent pas de détecter spécifiquement l'ensemble des NTM et que les méthodes de détection par bactériologie (chapitre I §II.1.b /) et biologie moléculaire (chapitre I §II.1.d /) nécessitent une harmonisation et une étude sur leur potentiel transfert à des matrices environnementales. Concernant, les méthodes d'identification qui impliquent toutes l'isolement préalable de la NTM, il semble que la MLSA soit la seule permettant de caractériser l'ensemble des espèces de NTM (chapitre I §II.2 /). Pour les méthodes de caractérisation des NTM, celles applicables aux NTM isolées ne permettent pas de caractériser l'ensemble des espèces de NTM (chapitre I §II.3.a /), et celles applicables directement à l'échantillon nécessitent, d'une part, une base de données de profils et, d'autre part, une vérification de spécificité (chapitre I §II.3.b /).

Etant actuellement difficile de hiérarchiser le degré de pathogénicité des espèces de NTM en raison de l'absence de critère de virulence (chapitre I §I.2 /), nous proposons d'étudier le genre *Mycobacterium* dans son ensemble et de ne pas privilégier une espèce de NTM particulière. Par ailleurs, la hiérarchisation des sources de NTM dans les bassins versants nécessitant une comparaison du degré de contamination des différents compartiments le composant, nous nous proposons donc de développer une méthode de quantification des NTM dans des échantillons environnementaux. Pour ce faire, sur la base de la synthèse des outils de détection des NTM, nous proposons d'harmoniser les outils de culture (chapitre I §II.1.b /) et de comparer la spécificité et la sensibilité des outils moléculaires développés pour des échantillons médicaux (chapitre I §II.1.d /), dans un objectif de quantification des NTM dans l'environnementaux (chapitre II). Une réflexion sur des développements futurs d'outils et stratégies de développement d'outils analytiques sera également menée (chapitre IV).

IV.3 / La stratégie de prélèvement

L'état de l'art sur le comportement des NTM dans l'environnement (chapitre I §I.3 /), et sur les sources des microorganismes potentiellement pathogènes dans les bassins versants (chapitre I §III /) nous indique que plusieurs compartiments des bassins versants n'ont à ce jour pas été étudiés vis-à-vis de l'occurrence des NTM (Figure 8). Effectivement, parmi les sources ponctuelles (chapitre I §III.1 /) et diffuses (chapitre I §III.2 /) des microorganismes potentiellement pathogènes, peu d'études font référence aux NTM. A ce jour, les sols riches en acide humiques des zones rurales (forêts, marécages), les sols riches en hydrocarbures des zones urbaines (origine pyrolytique anthropique des PAH) et les réseaux de distribution d'eau potables sont connus comme étant des habitats propices au développement des NTM (chapitre I §I.3.a /) et les eaux de surface en aval des bassins versants ainsi que les eaux souterraines peuvent être considérées comme les milieux récepteurs de NTM lors d'événements pluvieux (Figure 8) car la présence de NTM y est avérée (Le Dantec *et al.* 2002b ; Bland *et al.* 2005 ; Chilima *et al.* 2006). Entre ces habitats et ces milieux récepteurs d'origines urbaines, péri-urbaines ou rurales, la présence des NTM est possible dans les réseaux d'eau potable des maisons particulières, des centres médicaux, ou des centres récréatifs (Figure 8), mais aucune donnée n'existe sur la présence des NTM dans les autres compartiments des bassins versants telles que les WWTP, les RWTP et les citernes de récupération des eaux de pluie. Ainsi, plusieurs sources ponctuelles et diffuses seront donc évaluées (chapitre III).

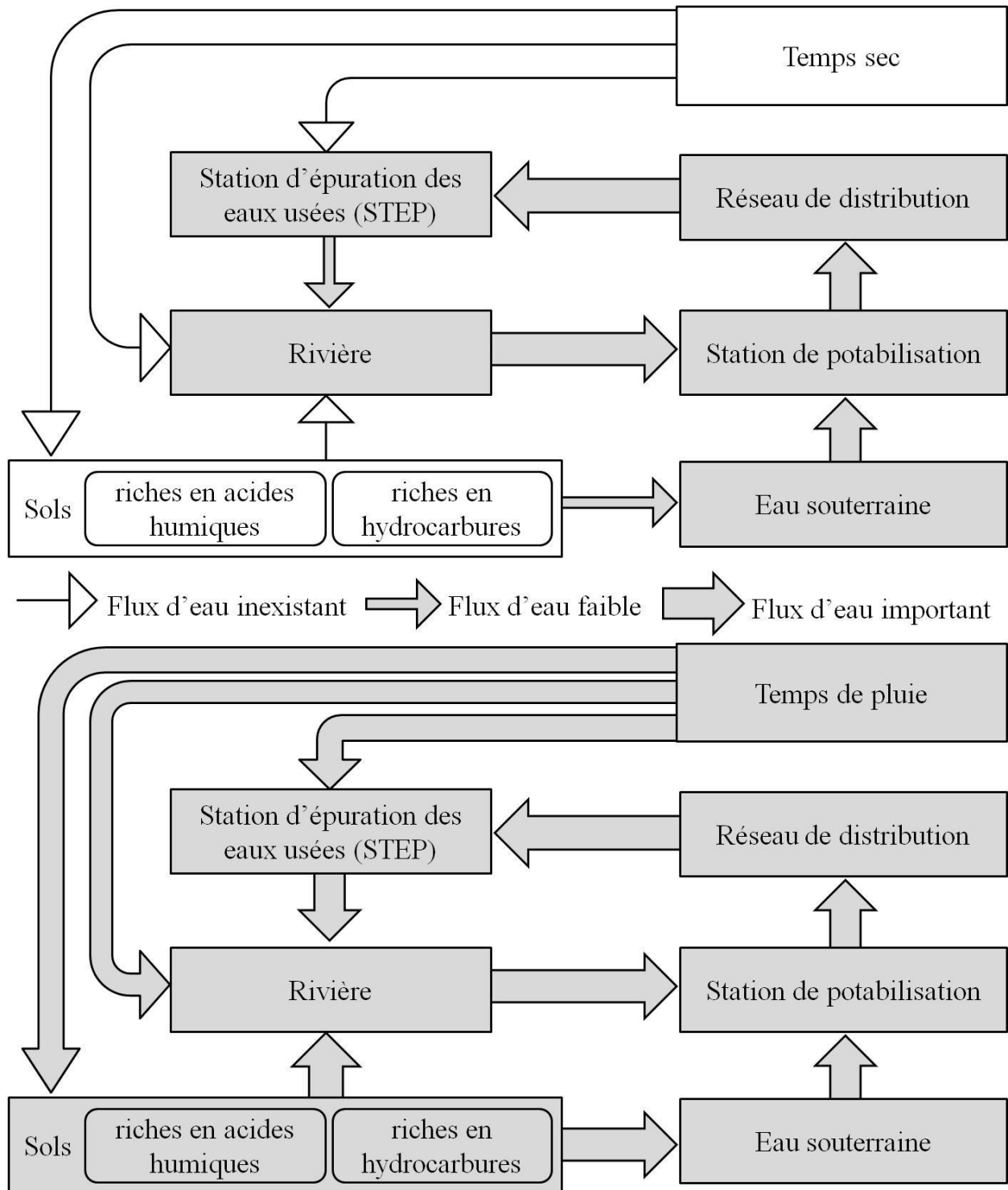


Figure 8 : Schéma conceptuel des habitats (rectangles) et vecteurs (flèches) potentiels des mycobactéries non-tuberculeuses dans les bassins versants de temps sec (en haut) et de temps de pluie (en bas)

- **Sources ponctuelles urbaines**

Dans l'objectif d'étudier les sources urbaines des NTM dans les bassins versants urbains, et en raison de la présence des NTM dans les réseaux de distribution d'eau et les réseaux d'eau potable dans les maisons particulières, les centres médicaux et les centres récréatifs (Tableau 7), ainsi que les quelques études rapportant leur présence dans les boues activées de station d'épuration (Berekaa et Steinbüchel 2000) et dans les eaux usées en entrée de station d'épuration (Whan *et al.* 2005), nous nous proposons d'étudier le devenir des mycobactéries au sein d'une station d'épuration à l'échelle des ouvrages de traitement par temps sec afin de combler ce manque de la littérature (chapitre III§II.1 /).

- **Sources diffuses péri-urbaines et rurales**

Le lessivage des sols semble apporter des NTM dans le milieu récepteur pendant les saisons humides, ce phénomène semble être corrélé avec l'apport en certains métaux Fe, Al, Cu, Co et Cr (Iivanainen *et al.* 1993). De plus, il semble que les sols riches en acides humiques et les sols pollués en PAH soient des habitats potentiels de NTM (chapitre I§I.3.a /). Néanmoins, ces deux types de sols n'ont jamais été comparés entre eux (Figure 8). Ainsi, nous envisageons d'étudier et de caractériser différents types de sols en zones urbaines, péri-urbaines et rurales afin de déterminer lesquelles de ces zones seraient les sources majeures de NTM dans les bassins versants (chapitre III§II.2 /).

Concernant les sources diffuses, aucune étude ne rapporte la présence de NTM dans les eaux de ruissellement. Effectivement, ce compartiment des bassins versants étant régi par de multiples facteurs telles que la pluviométrie, la topographie ou encore la nature des sols, la mesure directe de la quantité de NTM dans les eaux de ruissellement n'est généralement pas réalisée. Au sujet des eaux de ruissellement, même si des corrélations saisonnières ne sont pas clairement établies, il semble que les NTM soient majoritairement présentes dans les sols et l'eau (eau potable du robinet, eau de forage, eau de puits associés aux maisons particulières) pendant les saisons sèches (Chilima *et al.* 2006). Cette étude suggérerait que le ruissellement à l'occasion d'événements pluvieux pourrait lessiver les sols et entraîner les NTM dans d'autres compartiments récepteurs du bassin versant, c'est-à-dire dans les eaux souterraines ou les eaux de surface les plus en aval du bassin versant (Figure 8). Aussi, nous étudierons, indirectement, l'impact des eaux de ruissellement en déterminant l'apport d'affluents situés en zones urbaines et péri-urbaines à une rivière d'ordre supérieur, en l'occurrence la Marne (chapitre III§II.3 /).

*« L'empirisme n'est point la négation de la science expérimentale (...),
ce n'en est que le premier état »*

Claude Bernard

CHAPITRE II : DÉVELOPPEMENTS ANALYTIQUES POUR QUANTIFIER LES MYCOBACTÉRIES DANS L'ENVIRONNEMENT

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

I/ Introduction

L'état de l'art sur les outils analytiques applicables aux matrices environnementales (chapitre I §II /) souligne clairement que les méthodes de détection par bactériologie (chapitre I §II.1.b /) et biologie moléculaire (chapitre I §II.1.d /) nécessitent une harmonisation des protocoles et une étude d'applicabilité aux matrices environnementales. Dans cette optique, il a donc été entrepris de comparer des méthodes de bactériologie, ainsi que des méthodes de biologie moléculaire, avec comme objectif la quantification des NTM dans des échantillons environnementaux. Ainsi, le présent chapitre est organisé en trois parties présentées sous formes de trois articles. Deux de ces articles sont parus dans le journal *Applied Environmental Microbiology*, et le troisième a été soumis au journal *Canadian Journal of Microbiology*.

Article ① Radomski N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moilleron et F.S. Lucas (2010). Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(11): 3514-3520 (doi: 10.1128/AEM.02659-09).

Dans ce papier, les méthodes d'isolement des NTM, telles que les décontaminations chimiques et/ou les utilisations d'antibiotiques dans le milieu de culture ont été comparées sur des échantillons d'eau de surface, (i) pour étudier leur impact sur les microorganismes interférents et sur des échantillons d'eau de surface artificiellement inoculés par *M. chelonae* et *M. avium*, (ii) pour étudier l'impact sur des NTM à croissance rapide et lente (chapitre II §II.1 / article ①). Ces espèces ont été choisies comme modèles de FGM et de SGM présentant des incidences humaines importantes en France (Figure 3) et à l'étranger (Figure 4).

Article ② Radomski N., F.S. Lucas, R. Moilleron, E. Cambau, S. Haenn et L. Moulin (2010). Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(21): 7348-7351 (doi: 10.1128/AEM.00942-10).

Du fait de la présence en grande nombre de microorganismes interférents dans les échantillons de l'environnement et du fait des croissances lentes de nombreuses NTM, il nous a semblé judicieux de développer une technique de quantification moléculaire qui s'affranchisse des biais culturels. Afin de développer une méthode de quantification des mycobactéries par PCR en temps réel qui soit, à la fois, spécifique et sensible dans les échantillons environnementaux, des comparaisons de la spécificité et de la sensibilité de couples d'amorces PCR de la littérature, ont été entreprises *in silico* et *in vitro*. La nouvelle méthode développée a été comparée à deux méthodes existantes n'ayant jamais fait l'objet d'une vérification *in vitro*. La spécificité et la sensibilité de ces méthodes ont été évaluées respectivement avec un souche de microorganismes interférents isolés de la Seine et identifiés par séquençage de l'ARNr 16S ou 23S, et un souche de NTM isolées de la Seine et identifiées par séquençage de l'ARNr 16S et du gène *hsp65*. Ces deux collections ont été complétées avec des microorganismes de référence issus de collections internationales (chapitre II § II.2 / article ②).

Article ③ Radomski N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moilleron et F. Lucas (2010). Effective DNA extraction method for quantification of *Mycobacterium* spp. in surface water by real-time PCR. (soumis à *Canadian Journal of Microbiology*).

Dans ce papier, la méthode d'extraction d'ADN a été optimisée en vue de quantifier les NTM par PCR en temps réel dans les échantillons environnementaux. Des combinaisons de protocoles de lyse et de purification ont été comparées à partir d'échantillons d'eau de la Seine, artificiellement inoculés par *M. chelonae*, dans l'objectif de déterminer la méthode d'extraction d'ADN permettant de récupérer le plus d'ADN mycobactérien, tout en éliminant les inhibiteurs de PCR de la matrice environnementale (chapitre II §II.3 / article ③).

La méthode de PCR en temps réel est basée sur le principe la PCR découvert en 1987 par Kary Mullis, qui permet de détecter des régions nucléotidiques particulières par amplification exponentielle. La PCR classique est une analyse non quantitative en point final qui détecte l'absence ou la présence d'une région nucléotidique, alors que la PCR en temps réel est une méthode de quantification par cinétique qui suit au cours du temps le nombre de copies de l'élément ciblé. Pour l'ensemble des méthodes de quantification par PCR en temps réel, la détermination du seuil limite (C_T : Cycle Threshold) permet de réaliser une droite d'étalonnage. Le C_T correspond au cycle pour lequel l'amplification d'une cible est détectable, c'est-à-dire le cycle à partir duquel l'augmentation de la fluorescence est détectée. Plus la matrice d'ADN cible est en concentration importante avant amplification, plus le C_T va être faible, et inversement. La réalisation de la droite d'étalonnage va passer par la linéarisation de l'évolution des C_T d'une gamme de concentration en ADN, en fonction du logarithme décimal de la concentration en ADN de cette gamme (Figure 9). La limite de quantification base de cette méthode est la concentration minimale en ADN pour laquelle l'équation $C_T=f(\log[ADN])$ devient linéaire sous la forme d'une équation de type $Y=aX+b$. Effectivement, en dessous de cette concentration en ADN limite, les phénomènes stochastiques sont trop forts pour conserver une évolution constante du signal, l'équation est alors de la forme $Y=aX^2+bX+c$. La limite de quantification haute de cette méthode correspond à la concentration en ADN maximale à partir de laquelle la phase de bruit de fond n'est plus assez importante pour pouvoir être correctement mesurée, c'est-à-dire pour un C_T tendant vers zéro (Poitras et Houde 2002).

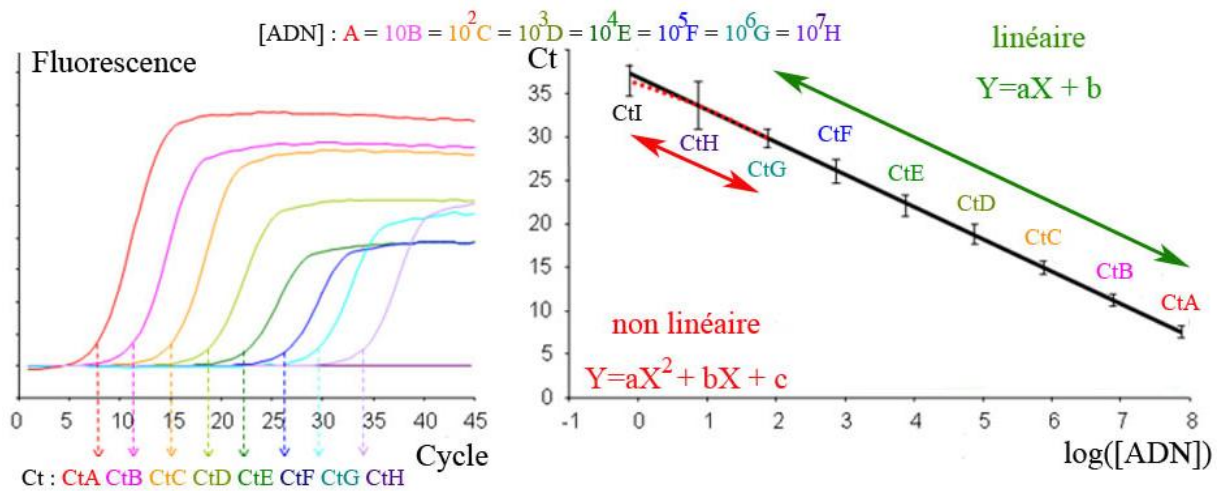


Figure 9 : Réalisation d'une droite d'étalonnage de PCR en temps réel par construction de l'évolution de la fluorescence en fonction des C_T d'une gamme de concentration en ADN (à gauche) et construction de la linéarisation des C_T moyens en fonction du logarithme décimal de la concentration en ADN (à droite)

Cette méthode d'étalonnage peut être utilisée pour des quantifications absolues ou relatives. La quantification absolue est utilisée pour des applications qui ne présentent pas de cible de référence avec laquelle une quantification relative serait envisageable. C'est la droite d'étalonnage $C_T=a.\log[ADN]+b$ extrapolée de la partie linéaire de la courbe de linéarisation (Figure 9) qui permet de calculer la concentration de la cible dans l'échantillon. Il est à noter que l'ordonnée à l'origine b n'a qu'une signification mathématique, car elle est issue d'une régression linéaire de la droite d'étalonnage. Cette droite d'étalonnage permet aussi de calculer l'efficacité (Ef: efficiency) $Ef=10^{(-1/a)}$, qui est la proportion d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle, c'est-à-dire la proportion de cibles détectées par la méthode. Expérimentalement, une efficacité entre 0,8 et 1 est bonne, car cela signifie qu'entre 80 et 100 % des cibles sont détectées. La quantification absolue ne prend pas en compte d'éventuelles inhibitions de PCR qui peuvent avoir lieu dans une matrice naturelle, car la gamme d'étalonnage n'est pas réalisée dans une matrice équivalente à la matrice d'étude. La quantification relative de gènes de référence, dont la concentration est connue, en parallèle de

la quantification de la cible, permet de tenir compte des phénomènes d'inhibition de PCR de la matrice, qui affecteraient de la même façon la cible et la référence. Il existe cinq principes de PCR en temps réel (Poitras et Houde 2002).

• **Intercalent SYBRTM Green I**

La PCR en temps réel utilisant l'intercalant d'ADN SYBRTM Green I comme agent fluorescent, est le principe le plus simple car il ne repose que sur le choix d'amorces d'amplification spécifiques. Le SYBRTM Green I est souvent utilisé car il est plus sensible que les autres intercalants d'ADN comme le bromure d'éthidium, le YO-PRO-1 et le Hoescht 33258 qui se fixe au sillon mineur de l'ADN. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le SYBRTM Green I non intercalé à l'ADN exhibe peu de fluorescence, puis durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence suit la quantité d'intercalant se fixant à l'ADN double brin naissant. Ainsi, après hybridation des amorces PCR (à environ 50-60°C), l'augmentation du signal de fluorescence est mesurée pendant l'étape d'élongation (à environ 60-70°C) et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé (à environ 90°C) au cycle suivant (Figure 10).

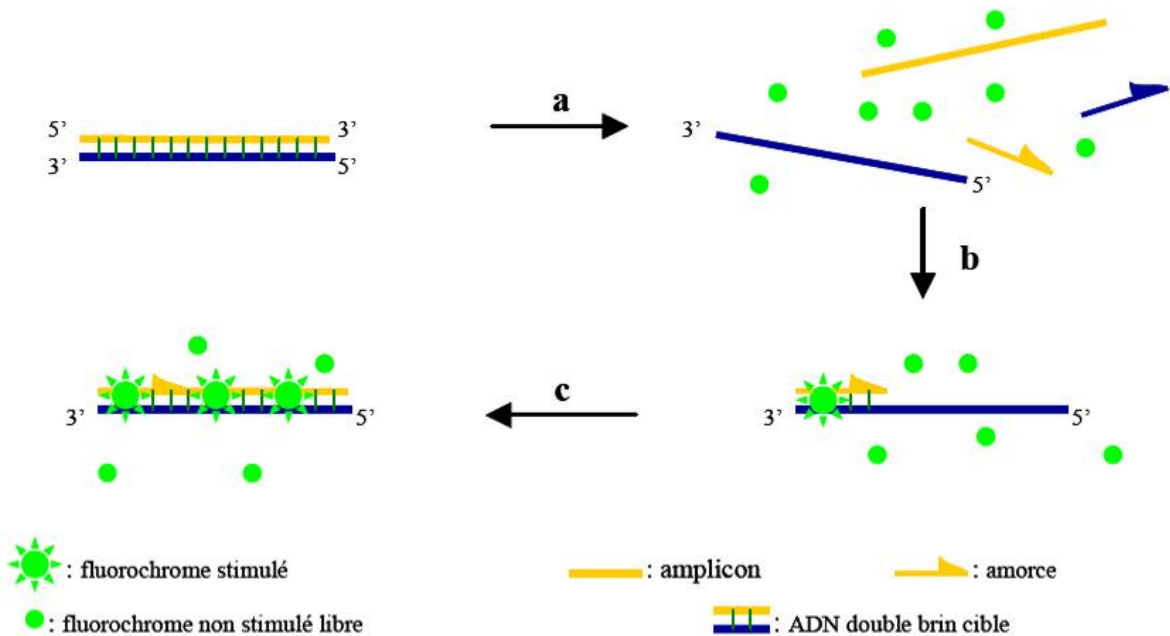


Figure 10 : Conditions et déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCR en temps réel basée sur l'utilisation du fluorochrome intercalant d'ADN SYBRTM Green I (Poitras et Houde 2002)

La spécificité de cette technique est évaluée par construction de la courbe de fusion. Cette courbe de fusion est la dérivée de la fluorescence mesurée par rapport au temps (dF/dt) représentée en fonction de la température. Pour une amplification spécifique ne produisant qu'un seul amplicon, la courbe de fusion ne présentera qu'un seul pic. La zone $dF/dt = 0$ de la courbe de fusion, représente l'augmentation constante au cours du temps de la fluorescence pendant l'intercalation du SYBRTM Green I aux amplicons néoformés. Le pic de la courbe de fusion représente la chute de fluorescence observée lorsque la dénaturation atteint la température de dissociation de l'unique amplicon produit. Ainsi, si des amplicons différents des amplicons cibles sont produits, il sera observé d'autres pics à des températures de fusion (T_m : melting temperature) différentes. Ceci pourrait être le cas lors de production de dimères d'amorces non détectables en PCR classique.

• **Hydrolyse de sonde TaqMan™**

Le principe de la PCR en temps réel TaqMan™ fait intervenir une sonde nucléique hybridée au produit d'amplification en plus des deux amorces PCR. Le principe de détection de l'amplification est basé sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase qui hydrolyse la sonde hybridée durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur, comme la 6-carboxyfluorescéine (FAM: 6-carboxy fluorescein), est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second suppresser fluorescent à l'extrémité 3', comme la 6-carboxy-tétraméthylrhodamine (TAMRA: 6-carboxy-tetramethylrhodamine) ou un suppresser non-fluorescent comme le BHQ® (black hole quencher®). Etant stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresser voisin par le principe du transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET: fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur au lieu d'émettre de la fluorescence. Ainsi de la fluorescence est émise lorsque le fluorochrome suppresser est trop éloigné du fluorochrome émetteur, c'est-à-dire lorsqu'à partir de l'une des amorces PCR, la Taq polymérase hydrolyse la sonde hybridée à chaque cycle d'amplification PCR (Figure 11). La conception de la sonde TaqMan™ nécessite les contraintes de développement suivantes : 1/ avoir un Tm de 5 à 10°C au dessus du Tm des amorces, afin qu'après la dénaturation (à environ +95°C), cette sonde s'hybride (à environ +70°C) avant les amorces PCR (à environ +60°C) dans le but d'être hydrolysée par la Taq polymérase (à environ +60°C) provenant de l'amorce PCR hybridée sur le même brin d'ADN ; 2/ avoir une longueur de 20 à 40 nucléotides pour respecter le principe FRET ; 3/ avoir un contenu en G-C de 40-60 % ; avoir un A, un C ou un T à l'extrémité 5' parce qu'un G supprime la fluorescence de l'émetteur même après clivage ; 4/ ne contenir aucun patron de séquence répétée ; 5/ ne contenir aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces ; 6/ utiliser des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes lors de développements multiplexes.

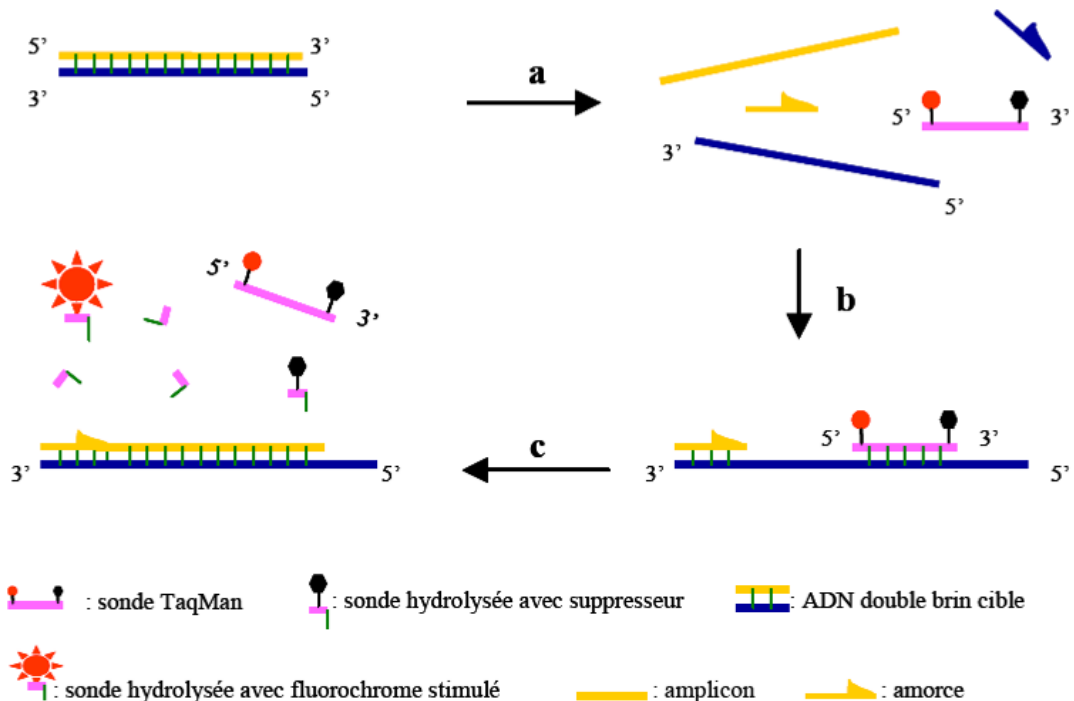


Figure 11 : Conditions et déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des sondes, d'hybridation des amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCR en temps réel basée sur l'utilisation d'une sonde TaqMan™ (Poitras et Houde 2002)

• **Hybridation à deux sondes**

L'hybridation à deux sondes repose sur l'utilisation de deux sondes linéaires complémentaires à la séquence cible pour maximiser la spécificité du signal. L'une des sondes est bloquée à son extrémité 3' afin de prévenir son extension durant l'étape d'élongation, et transporte en 3' un fluorochrome donneur : l'isothiocyanate-5 de fluorescéine (FITC: fluorescein isothiocyanate-5) qui produit une lumière fluorescente verte après excitation. L'autre sonde transporte en 5' un fluorochrome accepteur Red 640 ou Red 705. Les deux sondes sont arrangées en tête-à-queue et espacées de 10 nucléotides, afin que pendant l'hybridation le principe FRET permette au fluorochrome donneur émettant une fluorescence verte d'exciter le fluorochrome accepteur dont l'émission fluorescente rouge est détectée. La fluorescence rouge émise est alors proportionnelle à la quantité d'ADN cible amplifiée (Figure 12). La conception des deux sondes nécessite les contraintes de développement suivantes : 1/ les contraintes de conception d'une sonde TaqMan™ doivent être respectées ; 2/ la séquence cible doit être localisée vers l'extrémité 3' de l'amplicon ; 3/ les Tm des deux sondes doivent être similaires.

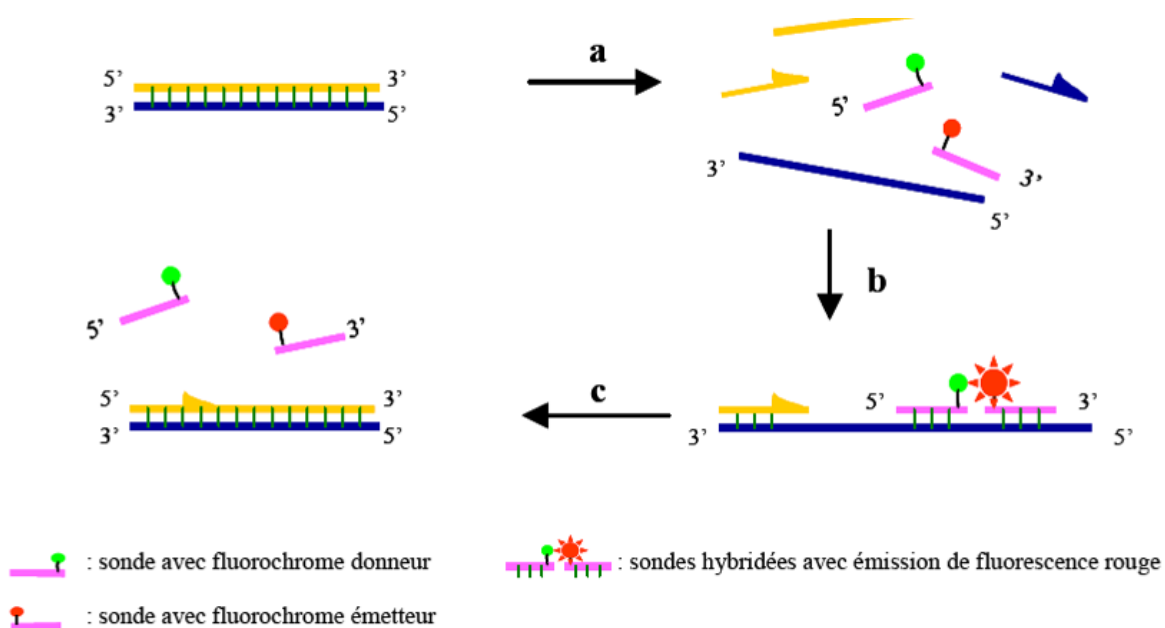


Figure 12 : Déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des sondes et amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCR en temps réel basée sur l'hybridation à deux sondes (Poitras et Houde 2002)

• **Balise moléculaire (Molecular BeaconTM)**

Cette balise moléculaire est dessinée en épingle à cheveux via des extrémités complémentaires et comprend en son centre la séquence complémentaire de la cible amplifiée à détecter. La balise moléculaire est encore plus spécifique que les sondes linéaires, car la balise moléculaire favorise surtout la formation de l'épingle à cheveux sauf en cas d'hybridation parfaite des séquences. Un émetteur fluorescent FAM, TAMRA, la tétra-chloro-6-carboxyfluorescéine (TET: tetra-chloro-6-carboxyfluorescein) ou la carboxy-X-rhodamine (ROX: carboxy-X-rhodamine) et le suppresseur 4-(4'-diméthylamino-phenylazo)-benzène (DABCYL: 4-(4'-diméthylamino-phenylazo)-benzene) sont fixés à chacune des extrémités de la balise, respectivement en 5' et 3'. Ce quencheur non fluorescent capte l'énergie dégagée par le rapporteur et le restitue, non pas sous forme de lumière visible comme c'est le cas pour la PCR en temps réel TaqmanTM, mais sous forme de rayonnement infra-rouge. A l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. Ensuite lors de l'hybridation des amorces PCR et de la balise, l'émetteur et le suppresseur sont tellement éloignés que la fluorescence de l'émetteur ne peut plus être inhibée par le suppresseur sur le principe du FRET. A l'étape de polymérisation, la balise moléculaire retourne en solution sous forme d'épingle à cheveux (Figure 13). La conception d'une balise moléculaire nécessite les contraintes de développement suivantes : 1/ les contraintes de conception des sondes TaqManTM doivent être respectées ; 2/ le tronc de la balise doit être court afin d'éviter l'éloignement entre l'émetteur et le suppresseur et un bruit de fond important ; 3/ les forces d'hybridation du tronc de la balise doivent être limitées pour que celle-ci puisse s'hybrider correctement à la cible et émettre de la fluorescence.

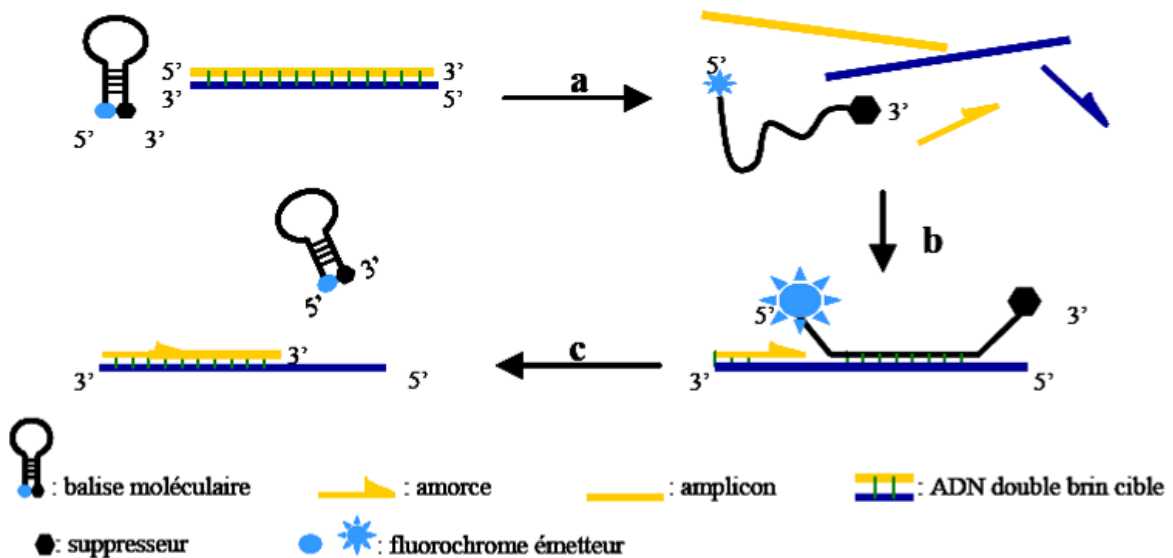


Figure 13 : Déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des sondes et amorces PCR (b) et d'élongation (c) de la PCRq en temps réel par balise moléculaire (Poitras et Houde 2002)

• **Amorces scorpion (scorpion primerTM)**

L'amorce scorpion est encore plus efficace que les sondes linéaires et que la balise moléculaire, en particulier pour le programme d'amplification à cycle court. L'amorce scorpion est une balise moléculaire présentant à son extrémité 3' un bloqueur de polymérisation de la sonde comme l'éthylène glycol lourd (HEG: heavy ethylene glycol), suivi de l'amorce PCR antisens. Cela permet d'intégrer à l'amplicon, l'amorce scorpion à chaque cycle d'amplification. A l'étape de dénaturation, l'amorce scorpion est sous forme relaxée et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. Après l'hybridation de l'amorce scorpion et de l'amorce anti-sens, la polymérisation a lieu. En suite, après une nouvelle étape de dénaturation, une étape d'hybridation de la partie balise moléculaire de l'amorce scorpion à la séquence cible complémentaire, permet à l'amorce scorpion de prendre une conformation linéaire, provoquant l'émission de fluorescence sur le principe du FRET (Figure 14). La conception d'une amorce scorpion nécessite de respecter les contraintes de conception des sondes TaqManTM et des balises moléculaires.

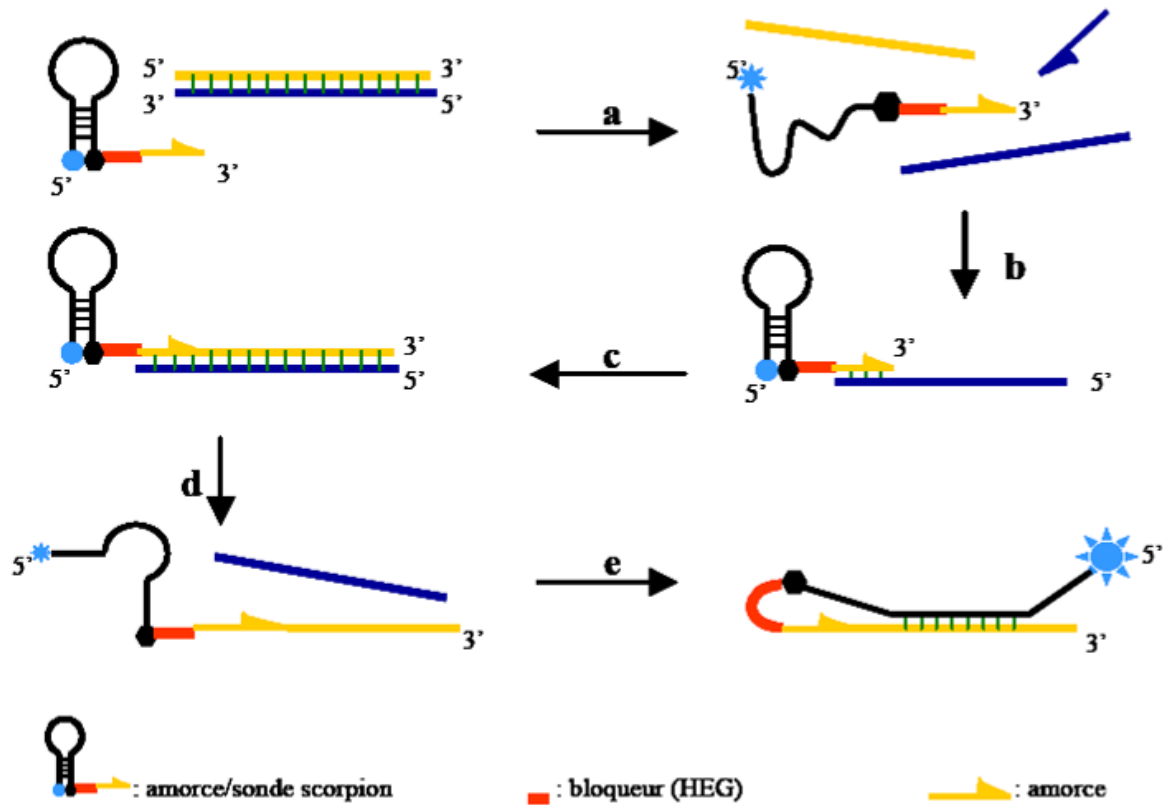


Figure 14 : Déroulement des étapes de dénaturation (a), d'hybridation des amorces PCR (b), d'élongation (c), de dénaturation secondaire (d) et d'hybridation de la balise moléculaire (e) de la PCR en temps réel par amorce scorpion (Poitras et Houde 2002)

II / Travaux entrepris**II.1 / Comparaison des méthodes de culture pour l'isolement des mycobactéries non-tuberculeuses dans les eaux de surface (publié en mars 2010 dans *Applied and Environmental Microbiology*)**

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2010, p. 3514–3520
0099-2240/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.02659-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 76, No. 11

Comparison of Culture Methods for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Surface Waters^{∇†}

Nicolas Radomski,^{1*} Emmanuelle Cambau,^{2,3} Laurent Moulin,⁴ Sophie Haenn,⁴
Régis Moilleron,¹ and Françoise S. Lucas¹

Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 Avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France¹; AP-HP, Hôpital Charles Foix, FR 94205 Ivry-sur-Seine, France²; AP-HP, Laboratoire Associé du Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance aux Antituberculeux, Hôpital Saint Louis, FR 75475 Paris, France³; and Eau de Paris, DRDQE (Direction Recherche et Développement Qualité Environnement), 144 Avenue Paul Vaillant Couturier, FR 75014 Paris, France⁴

Received 2 November 2009/Accepted 29 March 2010

The environment is the likely source of most nontuberculous mycobacteria (NTM) involved in human infections, especially pulmonary, skin, and soft tissue infections. In order to measure the prevalence of NTM in different aquatic ecosystems, we tried to standardize the culture methods used for surface water testing since many procedures have been described previously. Cultivation of mycobacteria requires long-term incubation in rich media and inactivation of rapidly growing microorganisms whose growth impedes observation of mycobacterial colonies. Consequently, the two criteria used for evaluation of the methods examined were (i) the rate of inhibition of nontarget microorganisms and (ii) the efficiency of recovery of mycobacteria. We compared the competitive growth of *Mycobacterium chelonae* and *M. avium* with nontarget microorganisms on rich Middlebrook 7H11-mycobactin medium after treatment by several chemical decontamination methods that included acids, bases, detergent, or cetylpyridinium chloride (CPC) with and without an antibiotic cocktail, either PANTA (40 U/ml polymyxin, 4 µg/ml amphotericin B, 16 µg/ml nalidixic acid, 4 µg/ml trimethoprim, and 4 µg/ml azlocillin) or PANTAV (PANTA plus 10 µg/ml vancomycin). Our results showed that treatment for 30 min with CPC (final concentration, 0.05%) of water concentrated by centrifugation, followed by culture on a rich medium supplemented with PANTA, significantly decreased the growth of nontarget microorganisms (the concentrations were $6.2 \pm 0.4 \log_{10}$ CFU/liter on Middlebrook 7H11j medium and $4.2 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/liter on Middlebrook 7H11j medium containing PANTA [$P < 0.001$]), while the effect of this procedure on NTM was not as great (the concentrations of *M. chelonae* on the two media were $7.0 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter and $6.9 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter, respectively, and the concentrations of *M. avium* were $9.1 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter and $8.9 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter, respectively). We propose that this standardized culture procedure could be used for detection of NTM in aquatic samples.

It is generally accepted that environmental exposure, particularly exposure through water, is the main source of most human infections caused by nontuberculous mycobacteria (NTM). The incidence of waterborne NTM skin and soft tissue infections in immunocompetent patients is increasing (31), as is the incidence of pulmonary infections that occur due to aerosol inhalation (15, 31). Ingestion or inhalation of contaminated water (while swimming, for instance) could also be a source of NTM infections in children (31). Because NTM are emerging pathogens for humans and domestic animals, it is important to identify their environmental sources and reservoirs and to measure their proliferation and persistence in freshwater ecosystems. A robust and standardized method for environmental detection of NTM is necessary to do this.

NTM are ubiquitous and can be isolated from a variety of

aquatic ecosystems, including natural water, wastewater, drinking water, recreational water, and industrial water (16, 51). Even hospital water has been reported to be contaminated by NTM (31). More precisely, aquatic plants, amoebae, and aquatic vertebrates and invertebrates could be considered NTM reservoirs in aquatic ecosystems in natural environments and in drinking water distribution systems or buildings and homes (19, 26, 37). Once present in a system, mycobacteria may proliferate and persist (4).

Typically, the methods usually used for detection of NTM are methods that are used for clinical microbiology and have not been adapted for environmental samples. Surface water samples are quite different from clinical samples, since they may contain low levels of NTM but typically contain highly diverse bacterial communities in which the concentrations of bacteria range from 10^4 to 10^7 cells per ml (54). This microbial diversity makes it likely that nontarget species will overgrow NTM in nutrient-rich medium. Several studies have been conducted to determine the optimum decontamination method for inhibiting the growth of nontarget bacteria in NTM assays, although most of the methods were developed for clinical samples (2, 8, 20, 42, 56). Moreover, no clear consensus for treatment of environmental samples has emerged from these studies. The combination of chemical decon-

* Corresponding author. Mailing address: Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 Avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France. Phone: 33(0)666665536. Fax: 33(0)145171627. E-mail: nicolas.radomski@cereve.enpc.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 2 April 2010.

TABLE 1. Chemical decontamination procedures for isolation of mycobacteria

Method	Decontamination reagent (concn)	Decontamination time (min)	Neutralization reagent (concn)
Löwenstein	H ₂ SO ₄ (4%)	15	NaOH (4%)
Petroff	NaOH (4%)	20	HCl (3%)
Tacquet-Tison	SDS (3%)-NaOH (1%) preheated at 37°C	30	H ₂ PO ₄ (1%)
Kubica	NaOH (2%)-N-acetyl-L-cysteine (0.5%)-Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (1.5%)	15	NaKPO ₄ , pH 6.8 (67 mM)
Oxalic acid	(COOH) ₂ (5%)	30	NaOH (4%)
Cetylpyridinium chloride	CPC (0.10%)	30	H ₂ O

tamination and addition of antibiotics to culture medium has not been studied previously for water surface samples.

The aim of this study was to develop and validate an improved method for detecting and counting NTM in surface water. To do this, we compared the results for recovery of mycobacteria from water samples and inactivation of nontarget microorganisms (fungi and bacteria other than mycobacteria) when various antibiotics and chemical decontaminants were used.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of surface water and artificial inoculation. Surface water samples were collected in triplicate between July 2008 and March 2009 from the Seine River (France) at water supply catchment sites near the Orly drinking water plant (DWP), Ivry DWP, and Joinville DWP. At each site, a 1-liter sample was collected in a sterile glass bottle used for bacterial analyses (Schott Duran). Samples were cooled to 4°C and transported to the laboratory within 6 h, and they were processed immediately after they arrived at the laboratory. The solids in each water sample were concentrated by centrifugation (7,000 × g, 15 min, 4°C), and the pellet was resuspended in a small volume of discarded supernatant, which was different in different experiments, as described below. Resuspended pellets were stored at 4°C before treatment.

To examine the recovery of mycobacteria, pellets were resuspended in 9 ml of supernatant and autoclaved for 20 min at 120°C before addition of 1 ml of a suspension containing a mixture of the fast-growing organism *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 (target cell titer, 10⁵ CFU/ml) and the slowly growing organism *M. avium* ATCC 25291 (target cell titer, 10⁷ CFU/ml) to obtain a final volume of 10 ml. To prepare the inoculum, the reference strains were cultivated on Löwenstein-Jensen medium (Bio-Rad) and transferred to API AUX medium (bioMérieux). Using a McFarland standard (a McFarland density of 3.0 corresponded to 10⁸ CFU/ml), the two strains were diluted appropriately with sterilized water and mixed. Because we had no information about the rate of cell loss with each decontamination method and in order to count cells after decontamination treatments, we used a high density of NTM that did not reflect the actual density in contaminated water. Inoculated autoclaved samples were designated "artificial samples." For all other experiments, centrifuged pellets from environmental samples were resuspended in 10 ml of supernatant, and the resulting samples are referred to below as "natural samples." The final volume of these samples was the same of that of the artificial samples described above.

Supplementation of media and growth conditions. All samples were inoculated onto Middlebrook 7H11j solid medium. This medium was prepared by supplementing Middlebrook 7H10 medium with 10% (vol/vol) oleic acid-albumin-dextrose-catalase enrichment (Becton Dickinson), 0.5% (vol/vol) glycerol, and 2 µg/ml mycobactin J (Synbiotics Corporation). Middlebrook 7H11j-PANTA medium was prepared by adding 2.0% (vol/vol) reconstituted PANTA PLUS antibiotic supplement (Becton Dickinson) to obtain the following final concentrations of antibiotics in the culture medium: 40 U/ml of polymyxin, 4 µg/ml of amphotericin B, 16 µg/ml of nalcidixic acid, 4 µg/ml of trimethoprim, and 4 µg/ml of azlocillin. Middlebrook 7H11j-PANTAV medium was prepared by adding 2.0% (vol/vol) reconstituted PANTA PLUS antibiotic supplement and 10 µg/ml of vancomycin (Sigma) to Middlebrook 7H11j medium.

Sterility (no contamination) and fertility (growth of *M. chelonae* ATCC 35752) on these three media were controlled by streaking sterilized water and cell suspension, respectively. In order to study the impact of antibiotics on NTM and nontarget microorganisms, artificial and natural samples from Orly, Ivry, and Joinville were inoculated onto Middlebrook 7H11j medium without antibiotics,

Middlebrook 7H11j-PANTA medium, and Middlebrook 7H11j-PANTAV medium.

Chemical decontamination procedures. Artificial and natural samples from the Orly site were independently treated using six different methods and inoculated onto Middlebrook 7H11j medium, Middlebrook 7H11j-PANTA medium, and Middlebrook 7H11j-PANTAV medium in order to study the impact of chemical decontamination methods on recovery of NTM and inhibition of nontarget microorganisms.

Chemical decontamination was performed by using the following steps: decontamination, agitation, centrifugation, and resuspension. Six chemical decontamination methods, designated the Löwenstein (5), Petroff (30), Tacquet-Tison (41), Kubica (23), oxalic acid (56), and cetylpyridinium chloride (CPC) (28) methods, were used in this study (Table 1). Equal volumes of decontamination reagents were added to 50-ml tubes containing 10 ml of a resuspended pellet, and then the samples were shaken at 20°C in a Kahn agitator for the required time. Neutralization was checked by adding 2 drops of litmus pH indicator, except for the Kubica and CPC methods, for which the volume of the neutralization reagent was 10 ml. The suspensions were then centrifuged (3,000 × g, 15 min, 4°C), and each pellet was resuspended in 2 ml of sterile distilled water before 10-fold dilution and inoculation onto Middlebrook 7H11j medium with or without antibiotics. A control treatment in which sterile water was used as the decontamination solution was included in order to determine the initial level of contamination.

Counting method and statistical analyses. After the chemical decontamination treatments, natural and artificial samples were diluted 10-fold in sterilized water, inoculated onto media, and incubated at 30°C in order to count nontarget microorganisms and the reference NTM. For natural water samples, colonies with different morphologies were counted on each plate and inoculated onto Löwenstein-Jensen medium that was incubated at 30°C for isolation. Mycobacteria and other acid-fast bacilli were detected with Ziehl-Neelsen acid-fast stain using a Quick-TB kit (Rutherford Appleton Laboratory). Acid-fast bacilli were then identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene and the *hsp65* gene as described below. The nontarget microorganisms included non-acid-fast bacteria and acid-fast bacteria that did not belong to the mycobacteria. Statistical analyses of data were carried out using a generalized linear model (GLM) in the Statgraphics Plus 5.1 software (Manugistics Inc., Rockville, MD).

Identification of acid-fast bacilli recovered from freshwater samples. In order to identify the acid-fast bacilli isolated from natural samples, the 16S rRNA gene (3) and the *hsp65* gene (22) were partially sequenced. Acid-fast colonies grown on Löwenstein-Jensen medium were resuspended in 100 µl of 1 × Tris-EDTA buffer (10 mM Tris [pH 7.6], 1 mM EDTA), and DNA was extracted by heat shock treatment (96°C for 15 min). After centrifugation (16,000 × g, 15 min, 4°C), the supernatant was used for PCR amplification. PCRs were carried out by using conditions described in a previous study (32) and using PCR primers and amplification cycles described previously (3, 22). Appropriate dilutions of amplicons were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and were marked separately in both senses with a BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Products were purified with a DyeEx 2.0 spin kit (Qiagen), and sequencing was carried out with an ABI PRISM 3100 genetic analyzer used according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems).

Consensus sequences were compared with sequences obtained from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BIBI (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebib/lebib.cgi>), and RIDOM (<http://www.ridom-rdna.de>) databases by performing phylogenetic analyses (data not shown).

Nucleotide sequence accession numbers. The consensus sequences of the 16S rRNA and *hsp65* genes of acid-fast bacilli have been deposited in the GenBank database under accession numbers FJ770974 to FJ770999.

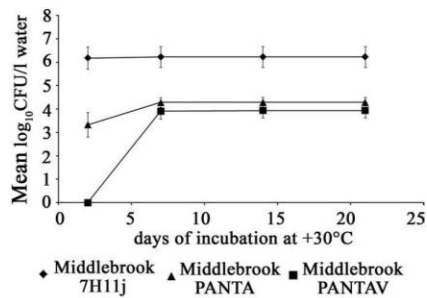


FIG. 1. Effect of addition of antibiotics to the medium on the numbers of growing nontarget microorganisms after different incubation times. Surface water samples were directly inoculated onto Middlebrook 7H11j medium with or without antibiotics. The error bars indicate standard deviations of the means.

RESULTS

Effect of addition of antibiotics to the culture medium. (i) Impact on overgrowth of nontarget microorganisms. The maximum densities of nontarget microorganisms were observed after 48 h of incubation on both Middlebrook 7H11j and Middlebrook 7H11j-PANTA media (Fig. 1). No nontarget microorganisms were detected on Middlebrook 7H11j-PANTAV medium after 48 h of incubation, and the maximum densities were observed after 7 days. After 14 and 21 days of incubation, filamentous fungal growth had started and interfered with counting of nontarget microorganisms even on Middlebrook 7H11j medium containing antibiotics (Fig. 1).

Addition of PANTA and addition of PANTAV to Middlebrook 7H11j medium resulted in significant 100-fold decreases in the densities of nontarget microorganisms (Fig. 1) compared to the results for Middlebrook 7H11j medium without antibiotics ($F = 120.19$, $df = 2$, $n = 108$, and $P < 0.001$, as determined by repeated-measures analysis by GLM and controlled by sampling area and incubation time). On average, after 21 days of incubation, the concentrations of nontarget microorganisms were $6.2 \pm 0.4 \log_{10}$ CFU/liter on Middlebrook 7H11j medium, $4.2 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/liter on Middlebrook 7H11j-PANTA medium, and $3.9 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/liter on Middlebrook 7H11j-PANTAV medium. There was no significant difference between the results for PANTA treatment and the results for PANTAV treatment ($F = 3.04$, $df = 1$, $n = 72$, and $P = 0.086$, as determined by repeated-measures analysis by GLM and controlled by sampling area and incubation time).

GLM analysis showed that the sampling area and the antibiotic treatment explained the observed variation in the density of nontarget microorganisms ($F = 20.82$, $df = 4$, $n = 108$, and $P < 0.001$, as determined by repeated-measures analysis by GLM and controlled by incubation time). Indeed, the densities of nontarget microorganisms on Middlebrook 7H11j medium after 7 days of incubation were $6.5 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/liter, $5.7 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter, and $6.3 \pm 0.4 \log_{10}$ CFU/liter for the Orly, Ivry, and Joinville catchment sites, respectively ($F = 20.98$, $df = 2$, $n = 108$, and $P < 0.001$, as determined by repeated-measures GLM and controlled by medium supplementation and incubation time).

(ii) Impact on recovery of NTM. GLM analysis showed that addition of PANTA and addition of PANTAV significantly de-

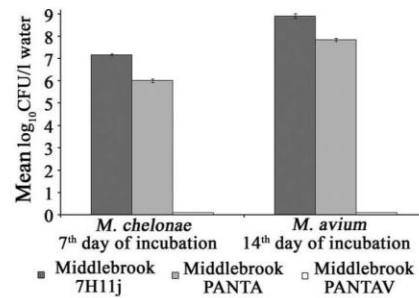


FIG. 2. Effect of addition of antibiotics to the medium on recovery of *M. chelonae* ATCC 35752 and *M. avium* ATCC 25291. The bars indicate the average numbers of mycobacteria recovered from artificial samples (9 experiments for each strain) inoculated onto Middlebrook 7H11j medium supplemented or not supplemented with antibiotics.

creased the densities of both strains examined ($F = 261.09$, $df = 2$, $n = 9$, and $P < 0.001$ for *M. chelonae*, as determined by GLM; $F = 52.99$, $df = 2$, $n = 9$, and $P < 0.001$ for *M. avium*, as determined by GLM). The densities of *M. chelonae* and *M. avium* were $7.17 \pm 0.04 \log_{10}$ CFU per liter and $8.91 \pm 0.10 \log_{10}$ CFU/liter, respectively, on Middlebrook 7H11j medium and $6.0 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter and $7.8 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter, respectively, on Middlebrook 7H11j-PANTA medium, whereas no growth was observed on Middlebrook 7H11j-PANTAV medium (Fig. 2).

Effect of chemical decontamination. (i) Impact on overgrowth of nontarget microorganisms. The effects of the differ-

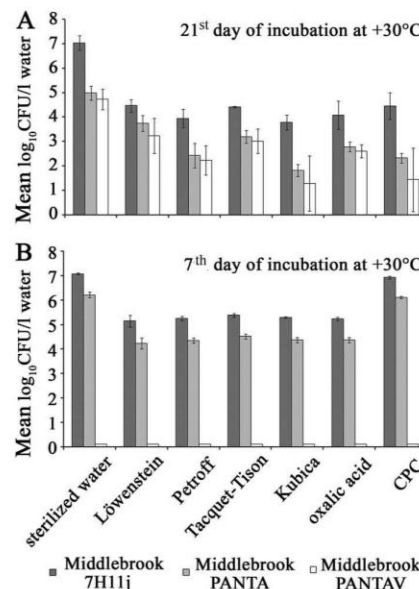


FIG. 3. Effect of chemical decontamination on (A) the numbers of nontarget microorganisms and (B) recovery of *M. chelonae* ATCC 35752. The average densities (numbers of CFU per liter) of nontarget microorganisms ($n = 378$) and of mycobacteria recovered from artificial samples ($n = 63$) isolated from Orly water samples inoculated onto Middlebrook 7H11j medium (with or without antibiotics) were determined after chemical decontamination. The error bars indicate standard deviations of the means.

ent chemical decontamination methods (Fig. 3A) were not significantly different ($F = 0.64$, $df = 5$, $n = 324$, and $P = 0.666$, as determined by repeated-measures GLM and controlled by medium supplementation and incubation time). The procedure used to count NTM CFU when there was no chemical decontamination treatment was hampered by the growth of non-acid-fast bacilli on Middlebrook 7H11j medium after 14 to 21 days of incubation and by the growth of fungi on Middlebrook 7H11j-PANTA and Middlebrook 7H11j-PANTAV media after 21 to 35 days. Compared to the results for the control treatment, every chemical decontamination treatment significantly decreased the density of the nontarget microorganisms ($F = 51.41$, $df = 6$, $n = 378$, and $P < 0.001$, as determined by repeated-measures GLM and controlled by medium supplementation and incubation time).

When antibiotics were not added, all chemical decontamination procedures resulted in an average count of $4.1 \pm 0.4 \log_{10}$ CFU/liter of nontarget microorganisms on Middlebrook 7H11j medium, which corresponded to a decrease of about 3 \log_{10} CFU/liter compared to the results for the control without a decontamination treatment on Middlebrook 7H11j medium (Fig. 3A). The combination of chemical decontamination and addition of antibiotics to the medium was more effective, because we observed a decrease of 4 to 4.5 \log_{10} CFU/liter in the level of nontarget microorganisms compared to the results for the control on Middlebrook 7H11j medium. All chemical decontamination procedures resulted in concentrations of $2.7 \pm 0.6 \log_{10}$ CFU/liter on Middlebrook 7H11j-PANTA medium and $2.4 \pm 0.7 \log_{10}$ CFU/liter on Middlebrook 7H11j-PANTAV medium (Fig. 3A).

(ii) Impact on NTM recovery. Compared to the results for the control treatment, all chemical decontamination methods (Löwenstein, Petroff, Tacquet-Tison, Kubica, oxalic acid, and CPC methods) significantly inhibited the growth of *M. chelonae* ($F = 276.66$, $df = 6$, $n = 63$, and $P < 0.001$, as determined by repeated-measures GLM and controlled by medium supplementation) and *M. avium* ($F = 59.11$, $df = 6$, $n = 63$, and $P < 0.001$, as determined repeated-measures GLM and controlled by medium supplementation). When the control treatment was removed from the GLM analysis, the impact of the CPC method was significantly less negative for *M. chelonae* ($F = 216.89$, $df = 5$, $n = 54$, and $P < 0.001$, as determined by GLM and controlled by medium supplementation) and *M. avium* ($F = 37.30$, $df = 5$, $n = 54$, and $P < 0.001$, as determined by GLM and controlled by medium supplementation) on Middlebrook 7H11j medium and Middlebrook 7H11j-PANTA medium. Indeed, after the control treatment $7.0 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter of *M. chelonae* and $9.1 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter of *M. avium* were recovered using Middlebrook 7H11j medium, whereas after the CPC treatment $6.9 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter of *M. chelonae* (Fig. 3B) and $8.9 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/liter of *M. avium* were recovered using this medium (data not shown). When vancomycin was added, there was no growth of either strain on Middlebrook 7H11j-PANTAV medium after all chemical decontamination treatments (Fig. 3B).

Isolation and identification of NTM from surface water. Thirteen acid-fast bacillus isolates were collected from the water samples and are described in Table S1 in the supplemental material. After phylogenetic analysis of the 16S rRNA and *hsp65* gene sequences (data not shown), 12 strains were

identified as mycobacteria, one strain was identified as *Rhodococcus* sp., and one strain was identified as *Nocardia* sp. (see Table S1 in the supplemental material). *M. chelonae* strains were regularly isolated from samples from the Orly catchment site on either Middlebrook 7H11j-PANTA medium or Middlebrook 7H11j-PANTAV medium (see Table S1 in the supplemental material), whereas no acid-fast bacilli were isolated from samples from the Ivry and Joinville catchment sites. However, the CFU quantities were less than 30 per plate, and thus the results did not allow reliable estimation of the densities of NTM at the Orly site (see Table S1 in the supplemental material).

Very diverse NTM were isolated from the Orly catchment site (8 different species). Rare species of mycobacteria (*M. psychrotolerans*, *M. setense*, *M. insubricum*, *M. porcinum*, *M. liatzerense*, *M. austroafricanum*, and *M. anupense*) were isolated sporadically from one of the triplicate samples on Middlebrook 7H11j, Middlebrook 7H11j-PANTA, or Middlebrook 7H11j-PANTAV medium after different kinds of chemical decontamination methods were used; *M. anupense*, *M. liatzerense*, *M. porcinum*, and *M. austroafricanum* were isolated after decontamination using the Tacquet-Tison method, *M. setense* and *M. psychrotolerans* were isolated after decontamination using the Löwenstein method, and *M. insubricum* was isolated after decontamination using the CPC method (see Table S1 in the supplemental material).

DISCUSSION

Our goal was to measure the effects of various methods known to inhibit the growth of nontarget microorganisms, while we also took into consideration the inhibitory effects of these methods on the growth of NTM. To our knowledge, this is the first time that addition of antibiotics to medium was combined with chemical decontamination (alone or in combination with addition of antibiotics during decontamination) and used to culture NTM from environmental water samples. We developed this bacteriological tool in order to use it for an extensive environmental analysis. Statistical analyses of our results demonstrated that the presence of PANTA significantly decreased the level of nontarget microorganisms, without being too aggressive against reference NTM. Nevertheless, the PANTA added did not remove all nontarget microorganisms from 1 liter of surface water. It does not seem advisable to decrease the sampling volume in order to avoid nontarget microorganisms, because decreasing the sampling volume would lead to a decrease in the lower limit of NTM detection. Chemical decontamination appeared to be necessary for highly sensitive detection of NTM. Decontamination with CPC appeared to be the best decontamination method since, on the one hand, it significantly decreased the level of nontarget microorganisms and, on the other hand, it was significantly less lethal for the NTM strains studied. Moreover, addition of PANTA and CPC decontamination were more efficient together than separately in terms of the objectives mentioned above. A statistical approach helped us determine the most appropriate method for NTM isolation, although the low numbers of NTM isolated from surface water did not allow accurate estimation of either the number or the diversity of NTM in the habitat.

Although filtration has been reported to be more effective than centrifugation for isolation of mycobacteria from drinking water (42), we used centrifugation for the Seine River samples due to the rapid clogging of filters by large quantities of suspended particles (20 to 92 mg/liter) (17). Different culture media have been used to isolate mycobacteria, but there has been no consensus (39). However, nutrient-rich Middlebrook 7H11 medium and a low incubation temperature ($\sim 32^{\circ}\text{C}$) seem to result in recovery of the widest range of *Mycobacterium* spp. (39). Reports have indicated that the sensitivity of Middlebrook 7H11 medium is improved by addition of mycobactine J (13, 40), and the specificity can be improved by addition of the PANTA antibiotic cocktail. The PANTA additive was initially used for detection of mycobacteria in clinical samples using BACTEC (Becton Dickinson) liquid medium detection systems (36). Two previous studies of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* prevalence showed that PANTA used without a preliminary chemical decontamination step successfully suppressed the growth of background microorganisms associated with Cheddar cheese (13) and with raw milk cheeses (38). Additionally, inhibition of nontarget microorganisms in culture medium could be improved by addition of vancomycin at a final concentration of 8 $\mu\text{g/ml}$ (13), 10 $\mu\text{g/ml}$ (11), or 20 $\mu\text{g/ml}$ (1). In the present study, addition of the PANTA antibiotic cocktail appeared to significantly decrease the level of nontarget microorganisms, but it did not inhibit the growth of *M. chelonae* and *M. avium* so that they could not be quantified. Two previous studies of the prevalence of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in Cheddar cheese (13) and in raw milk cheeses (38) showed that addition of PANTA to Middlebrook 7H11j medium effectively removed nontarget microorganisms. However, we found that addition of PANTA was not sufficient to allow accurate enumeration of NTM in surface water. The concentrations of bacteria in raw milk cheeses usually range from 10^8 to 10^9 cells per ml depending on the ripening time (6), while freshwater usually contains between 10^4 and 10^7 cells per ml (54). Thus, it seems that the concentrations of nontarget microorganisms do not explain the finding that addition of PANTA was not sufficient to allow enumeration of NTM in surface water. In contrast, the higher diversity of microorganisms in surface water (21, 55) than in raw milk cheeses (34) could explain the finding that addition of PANTA was not sufficient to allow enumeration of NTM in surface water.

Addition of vancomycin to PANTA did not seem to be useful for counting NTM in surface water samples, because there was no significant difference between the effect of PANTA addition and the effect of PANTAV addition on removal of nontarget microorganisms. Moreover, on Middlebrook 7H11j-PANTAV medium, the growth of the *M. chelonae* and *M. avium* reference strains was significantly inhibited by vancomycin. Although these results cannot be extended to other NTM species that might be isolated from natural samples (some species may be less sensitive to vancomycin), vancomycin should not be added to media used for general NTM detection.

Our study showed that the CPC method was the most effective method studied for counting NTM in surface waters. This is in agreement with the results of Neumann et al., who showed that the CPC method was appropriate for decontamination of surface water (28). We found that CPC decontamination sig-

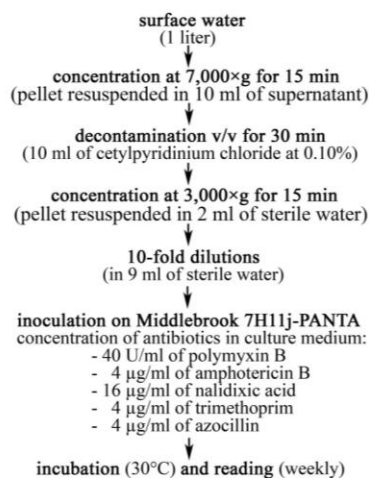


FIG. 4. Proposed microbial culture procedure for detection and measurement of mycobacteria in freshwater samples.

nificantly reduced the level of nontarget microorganisms, while it resulted in a smaller decrease in the density of NTM than the Lowenstein, Petroff, Tacquet-Tison, Kubica, and oxalic acid methods. Moreover, CPC can be used at different concentrations for decontamination of samples containing low (0.005% CPC) or high (0.05% CPC) levels of contaminating organisms (28). This method has been used mainly for samples with low levels of contamination, such as drinking water (49), water from distribution systems (29, 52), and tap water artificially inoculated with NTM (42). In our study, treatment with 0.05% CPC without antibiotics resulted in survival rates of 71.1% for *M. chelonae* and 70.0% for *M. avium*. In contrast, Thomson et al. reported that addition of 0.005% CPC to tap water samples spiked with *M. avium* and *M. intracellulare* (100 CFU/500 ml) resulted in a survival rate of only 3.6% for both strains (42). However, it is difficult to compare the results of these workers with our results, because the inocula (NTM densities and species), final concentrations of CPC (0.005% and 0.05%), and types of samples (surface water and tap water) were different.

Our study demonstrated for the first time that chemical decontamination and addition of PANTA to culture media are more effective together than separately for decreasing the concentrations of nontarget microorganisms. We thus recommend use of CPC decontamination (final concentration, 0.05%) combined with addition of PANTA to Middlebrook 7H11j medium for isolating and/or counting NTM in highly contaminated samples, such as surface waters (Fig. 4).

The diversity of NTM in the Orly water supply catchment was high, and the isolates included species such as *M. austroafricanum*, *M. porcinum*, and *M. chelonae*, as well as other more recently described species, such as *M. arupense*, *M. insubricum*, *M. llutzerense*, *M. psychrotolerans*, and *M. setense*. *M. chelonae* was the predominant NTM in the Seine River at the Orly sampling site. This species has been isolated previously from a water distribution system (51), tap water (12), treated surface water or groundwater (25), nail salon water (35), and public swimming pools (31). *M. chelonae* is an opportunistic pathogen that is able to cause pulmonary infections, cutaneous infections

after direct contact with contaminated water (35), or iatrogenic infections after surgery or subcutaneous injection (7, 33). Consequently, its presence in the water supply catchment may be a concern for water production in Paris.

Except for *M. psychrotolerans*, all of the strains isolated from the Orly water supply catchment were potential pathogens (10, 18, 24, 43, 44, 47, 48, 50, 53). These results show that water supply sources may contain very diverse NTM that could be potentially harmful to humans. In addition to NTM, the Seine River contained other harmful pathogens, including *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp., and *Salmonella* sp. (27, 46). Processes associated with potable water cycling and distribution or treatment and reuse of wastewater treatment plant rejects might be significant vehicles for NTM dissemination. Tap water has been suspected or identified as the source of infection in several cases (9, 14, 33, 45). Thus, determining the abundance of NTM in water resources might be an important public health issue. Our culture method might be useful for this purpose.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the PIREN-Seine program (<http://www.sisyph.jussieu.fr/internet/piren/>) and by a grant from STEA (Service Technique de l'Eau et de l'Assainissement) of City of Paris.

We are grateful to Wladimir Sougakoff, Gerald Millot, and Claudine Wichlacz of the Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux anti-tuberculeux at the Hôpital de la Pitié-Salpêtrière for advice on identification procedures and for providing reference strains. We thank colleagues from the Hôpital Charles Foix, especially Salah Gallah, and Marie-Noëlle Gamard for their help with the experiments, Lionel Deforges of Henri Mondor Hospital for discussions, and Laetitia Betelli for preliminary work. We also thank Karl Rockne of the University of Illinois at Chicago for his contribution to the language in the paper and reviewers for their constructive comments and improvements.

REFERENCES

- Anargyros, P., D. S. J. Astill, and I. S. L. Lim. 1990. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28:1288-1291.
- Bange, F. C., and E. Böttger. 2002. Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:546-548.
- Ben-Dov, E., O. H. Shapiro, N. Siboni, and A. Kushmaro. 2006. Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6902-6906.
- Bland, C. S., J. M. Ireland, E. Lozano, M. E. Alvarez, and T. P. Primm. 2005. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5719-5727.
- Buijtelts, P. C. A. M., and P. L. C. Petit. 2005. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J. Microbiol. Methods* 62:83-88.
- Callon, C., J. L. Berdague, E. Dufour, and M. C. Montel. 2005. The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of saers-type cheeses. *J. Dairy Sci.* 88:3840-3850.
- Carbonne, A., F. Brossier, I. Arnaud, I. Bougniza, E. Caumes, J. P. Menin-gaud, S. Dubrou, V. Jarlier, E. Cambau, and P. Astagneau. 2009. Outbreak of nontuberculous mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. *J. Clin. Microbiol.* 47:1961-1964.
- Carson, L. A., L. B. Cusick, L. A. Bland, and M. S. Favero. 1988. Efficacy of chemical dosing methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1756-1760.
- Chang, C. T., L. Y. Wang, C. Y. Liao, and S. P. Huang. 2002. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3159-3161.
- Cloud, J. L., J. J. Meyer, J. I. Pounder, K. C. Jost, A. Sweeney, K. C. Carroll, and G. L. Woods. 2006. *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1413-1418.
- Collins, M. T., K. B. Kenefick, D. C. Sockett, R. S. Lambrecht, J. McDonald, and J. B. Jorgensen. 1990. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28:2514-2519.
- Covert, T. C., M. R. Rodgers, A. L. Reyes, and G. N. Stelma. 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2492-2496.
- Donaghy, J. A., N. L. Totton, and M. T. Rowe. 2003. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:285-291.
- Falkinham, J. O. 2003. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can. J. Infect. Dis.* 14:281-286.
- Falkinham, J. O. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* 9:763-767.
- Falkinham, J. O., G. Nichols, J. Bartram, A. Dufour, and F. Portaels. 2004. Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance, p. 15-25. In S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour, and J. Cotruvo (ed.), *Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management*. IWA Publishing, London, United Kingdom.
- Gasper, J., S. Garnaud, V. Rocher, and R. Moilleron. 2009. Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: case study of Paris (France). *Sci. Total Environ.* 407:2900-2908.
- Gomila, M., A. Ramirez, J. Gasco, and J. Lalucat. 2008. *Mycobacterium llutzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2769-2773.
- Heckert, R. A., S. Elankumaran, A. Milani, and A. Baya. 2001. Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. *J. Clin. Microbiol.* 39:710-715.
- Kamala, T., C. N. Paramasivan, D. Herbert, P. Venkatesan, and R. Prabhakar. 1994. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1021-1024.
- Kenzaka, T., N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. 1998. rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology* 144:2085-2093.
- Kim, H. Y., Y. J. Yun, C. G. Park, D. H. Lee, Y. K. Cho, B. J. Park, S. I. Joo, E. C. Kim, Y. J. Hur, B. J. Kim, and Y. H. Kook. 2007. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. *J. Clin. Microbiol.* 45:3127-3130.
- Kubica, G. P., A. J. Kaufmann, and W. E. Dye. 1964. Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 89:284-286.
- Lamy, B., H. Marchandin, K. Hamitouche, and F. Laurent. 2008. *Mycobacterium setense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum*-group organism isolated from a patient with soft tissue infection and osteitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:486-490.
- Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumontier, S. Dubrou, and V. Vincent. 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5318-5325.
- Marsollier, L., T. Stinear, J. Aubry, J. P. St. André, R. Robert, P. Legras, A. L. Manceau, C. Audrain, S. Bourdon, H. Kouakou, and B. Carbone. 2004. Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1097-1103.
- Mons, C., A. Dumètre, S. Gosselin, C. Galliot, and L. Moulin. 2009. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Res.* 43:211-217.
- Neumann, M., R. Schulze-Robbecke, C. Hagenau, and K. Behringer. 1997. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:547-552.
- Norton, C. D., M. W. LeChevallier, and J. O. Falkinham. 2004. Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water Res.* 38:1457-1466.
- Petroff, S. A. 1915. A new and rapid method for the isolation and cultivation of the tubercle bacillus directly from sputum and feces. *J. Exp. Med.* 21:38.
- Primm, T., C. A. Lucero, and J. O. Falkinham. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:98-106.
- Radomski, N., V. C. Thibault, C. Karoui, K. de Cruz, T. Cochard, C. Gutiérrez, P. Supply, F. Biet, and M. L. Boschirol. 2010. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS2111 restriction fragment length polymorphism typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 48:1026-1034.
- Rajini, M., S. R. Prasad, R. R. Reddy, R. V. Bhat, and K. R. Vimala. 2007. Postoperative infection of laparoscopic surgery wound due to *Mycobacterium chelonae*. *Indian J. Med. Microbiol.* 25:163-165.
- Samelis, J., A. Lianou, A. Kakouri, C. Delbès, I. Rogelj, B. Bogović-Mati-jašić, and M. C. Montel. 2009. Changes in the microbial composition of raw milk induced by thermization treatments applied prior to traditional Greek hard cheese processing. *J. Food Prot.* 72:783-790.
- Snizek, P. J., B. S. Graham, H. B. Busch, E. R. Lederman, M. L. Lim, K. Poggemyer, A. Kao, M. Mizrahi, G. Washabaugh, M. A. Yakrus, and K. L. Winthrop. 2003. Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. *Arch. Dermatol. Res.* 139:629-634.
- Stager, C. E., J. P. Libonati, S. H. Siddiqi, J. R. Davis, N. M. Hooper, J. F.

- Baker, and M. E. Carter. 1991. Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *J. Clin. Microbiol.* **29**:154–157.
37. Steinert, M., K. A. Birkeness, E. H. White, B. Fields, and F. Quim. 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2256–2261.
38. Stephan, R., S. Schumacher, T. Tasara, and I. R. Grant. 2007. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J. Dairy Sci.* **90**:3590–3595.
39. Stinear, T., T. Ford, and V. Vincent. 2004. Analytical methods for the detection of waterborne and environmental pathogenic mycobacteria, p. 55–73. In S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour, and J. Cotruvo (ed.), *Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management*. IWA Publishing, London, United Kingdom.
40. Sung, N., and M. T. Collins. 2003. Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6833–6840.
41. Tacquet, A., and F. Tison. 1961. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **100**:676–680.
42. Thomson, R., R. Carter, C. Gilpin, C. Coulter, and M. Hargreaves. 2008. Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3094–3098.
43. Toro, A., T. Adekambi, F. Cheynet, P. E. Fournier, and M. Drancourt. 2008. *Mycobacterium setense* infection in humans. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:1330–1332.
44. Tortoli, E., S. Baruzzo, Y. Heijdra, H. P. Klenk, S. Lauria, A. Mariottini, and J. van Ingen. 2009. *Mycobacterium insubricum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1518–1523.
45. Tortoli, E., R. M. Kroppenstedt, A. Bartoloni, G. Caroli, I. Jan, J. Pawlowski, and S. Emler. 1999. *Mycobacterium tusciae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1839–1844.
46. Tournon, A., T. Berthe, G. Gargala, M. Fournier, M. Ratajczak, P. Servais, and F. Petit. 2007. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Mar. Pollut. Bull.* **54**:1441–1450.
47. Trujillo, M., E. Velazquez, R. M. Kroppenstedt, P. Schumann, R. Rivas, P. F. Mateos, and E. Martinez-Molina. 2004. *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1459–1463.
48. Tsai, T. F., C. C. Lai, C. Tsai, C. H. Chang, C. H. Hsiao, and P. R. Hsueh. 2008. Tenosynovitis caused by *Mycobacterium anupense* in a patient with diabetes mellitus. *Clin. Infect. Dis.* **47**:861–863.
49. Tsintzou, A., A. Vantarakis, O. Pagonopoulou, A. Athanassiadou, and M. Papapetropoulou. 2000. Environmental mycobacteria in drinking water before and after replacement of the water distribution network. *Water Air Soil Pollut.* **120**:273–282.
50. Tsukamura, M., H. J. van der Meulen, and W. O. K. Grabow. 1983. Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. nov. and *Mycobacterium diemhoferi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:460–469.
51. Vaerewijck, M. J. M., G. Huys, J. C. Palomino, J. Swings, and F. Portaels. 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems; ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:911–934.
52. Vantarakis, A., A. Tsintzou, A. Diamandopoulos, and M. Papapetropoulou. 1998. Nontuberculosis mycobacteria in hospital water supplies. *Water Air Soil Pollut.* **104**:331–337.
53. Wallace, R. J., B. A. Brown-Elliott, R. W. Wilson, L. Mann, L. Hall, Y. Zhang, K. C. Jost, J. M. Brown, A. Kabani, M. F. Schinsky, A. G. Steigerwalt, C. J. Crist, G. D. Roberts, Z. Blacklock, M. Tsukamura, V. Silcox, and C. Turenne. 2004. Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5689–5697.
54. Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:6578–6583.
55. Winter, C., T. Hein, G. Kavka, R. L. Mach, and A. H. Farnleitner. 2007. Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:421–431.
56. Yajko, D. M., P. S. Nassos, C. A. Sanders, P. C. Gonzalez, A. L. Reingold, C. R. Horsburgh, P. C. Hopewell, D. P. Chin, and W. K. Hadley. 1993. Comparison of four decontamination methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from stools. *J. Clin. Microbiol.* **31**:302–306.

Supplementary Table 1. Details of isolation conditions of acid-fast bacilli recovered from Orly surface water.

Strain codification	Date of sampling	Decontamination method	Supplementation of Middlebrook	CFU *	accession number		Identification by 16S rRNA and <i>hsp65</i> sequencing
					16S rRNA	<i>hsp65</i>	
MC1	July 2008	none	7H11j-PANTA	15/8/5	FJ770974	FJ770987	<i>Mycobacterium chelonae</i>
MC2	July 2008	none	7H11j-PANTAV	2/8/11	FJ770975	FJ770988	<i>Mycobacterium chelonae</i>
MC3	July 2008	sterilized water	7H11j-PANTA	6/9/19	FJ770976	FJ770989	<i>Mycobacterium chelonae</i>
MC4	October 2008	sterilized water	7H11j-PANTAV	15/8/22	FJ770977	FJ770990	<i>Mycobacterium chelonae</i>
MC5	October 2008	Löwenstein	7H11j	1/0/0	FJ770979	FJ770992	<i>Rhodococcus</i> sp.
MC6	October 2008	Löwenstein	7H11j	5/0/0	FJ770980	FJ770993	<i>Mycobacterium psychrotolerans</i>
MC7	October 2008	Löwenstein	7H11j	1/0/0	FJ770981	FJ770981	<i>Mycobacterium setense</i>
MC8	October 2008	CPC	7H11j	1/0/0	FJ770982	FJ770995	<i>Mycobacterium insubricum</i>
MC9	October 2008	Tacquet Tison	7H11j PANTA	1/0/0	FJ770983	FJ770996	<i>Mycobacterium porcinum</i>
MC10	October 2008	Tacquet Tison	7H11j PANTA	1/0/0	FJ770984	FJ770997	<i>Mycobacterium llatzerense</i>
MC11	October 2008	Tacquet Tison	7H11j	1/0/0	FJ770986	FJ770999	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>
MC12	October 2008	Kubica	7H11j PANTAV	1/0/0	FJ770974	FJ770987	<i>Nocardia</i> sp.
MC13	October 2008	Tacquet Tison	7H11j PANTAV	1/0/0	FJ770975	FJ770988	<i>Mycobacterium arupense</i>

* in triplicate sample per plate

II.2 / Développement d'une méthode de PCR en temps-réel pour détecter et énumérer *Mycobacterium* spp. dans l'eau de surface (publié en septembre 2010 dans *Applied and Environmental Microbiology*)

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2010, p. 7348–7351

0099-2240/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.00942-10

Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 76, No. 21

Development of a Real-Time qPCR Method for Detection and Enumeration of *Mycobacterium* spp. in Surface Water[†]

Nicolas Radomski,^{1*} Françoise S. Lucas,¹ Régis Moilleron,¹ Emmanuelle Cambau,^{2,3} Sophie Haenn,⁴ and Laurent Moulin⁴

Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (LEESU) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 Avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France¹; AP-HP, Hôpital Charles Foix, FR 94205 Ivry-sur-Seine, France²; Université Paris Diderot, Laboratoire Associé du Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance aux Antituberculeux, AP-HP, Hôpital Saint Louis, FR 75475 Paris, France³; and Eau de Paris, DRDQE (Direction Recherche et Développement Qualité de l'Eau), 33 Avenue Jean Jaurès, FR 94200 Ivry-sur-Seine, France⁴

Received 17 April 2010/Accepted 7 September 2010

A real-time quantitative PCR method was developed for the detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. from environmental samples and was compared to two other methods already described. The results showed that our method, targeting 16S rRNA, was more specific than the two previously published real-time quantitative PCR methods targeting another 16S rRNA locus and the *hsp65* gene (100% versus 44% and 91%, respectively).

Water exposure (15) is one source of human infection caused by nontuberculous mycobacteria (NTM). Nevertheless, the isolation and enumeration of NTM from water is difficult because other microorganisms overgrow NTM colonies (22). Consequently, the development of an alternative detection and enumeration method is essential for monitoring NTM sources in the environment.

Two real-time quantitative PCR (qPCR) methods for NTM measurement have been described (7, 29). The primer pair used in the first real-time qPCR method (7) targets 16S rRNA and was previously used to track mycobacterial growth in industrial water samples by conventional PCR (31). It was presented as a sensitive test for members of the *Mycobacterium* genus because it detected 34 species of mycobacteria (19, 25). However, the primer specificity was only measured by conventional PCR against DNA of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* (31) or by *in silico* analysis (7). The second real-time qPCR method, targeting the *hsp65* gene (29), was also sensitive (detection of 34 out of 37 *Mycobacterium* spp. tested). Although the primers showed high specificity (no detection of 16 different nonmycobacterial species) by conventional PCR (21), their specificity combined with the qPCR probe was only tested against *Candida albicans* DNA (29).

We sought to develop a reliable real-time qPCR method to detect *Mycobacterium* spp. in water samples. The development involved *in silico* primer screening followed by a specificity study by conventional PCR. Furthermore, the efficiency (Ef),

correlation coefficient (r^2), limit of quantification (LOQ), specificity (Sp), and sensitivity (Ss) of this new method targeting 16S rRNA were compared with those of the two previously described methods (7, 29).

DNA collection. Fifty nontarget microorganisms were isolated from surface water of the Seine River (Paris, France) and identified by sequencing of the bacterial 16S rRNA gene (MicroSeq 500 kit) or fungal 28S rRNA gene (D2 large-subunit rRNA kit) using an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) (14, 24, 27). Sequences were analyzed with the Mega BLAST algorithm and submitted to GenBank under the accession numbers GU265670 to GU265719. Reference microorganisms phylogenetically distant from the *Mycobacterium* genus, such as *Helicobacter* sp., were included in the nontarget collection. Reference microorganisms closely related to the *Mycobacterium* genus, such as *Corynebacterium*, *Nocardia*, and *Rhodococcus*, which together with *Mycobacterium* belong to the CNM (corynebacteria, nocardia, and mycobacteria) group, were also included in the nontarget collection. The sensitivities of the real-time qPCR methods were estimated using 30 species of the *Mycobacterium* genus (see Table S1 in the supplemental material) isolated from clinical cases or surface water (22). After growth, colonies were suspended in 1× TE buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 1 mM EDTA). DNA was extracted as previously described (22), and the DNA concentration was estimated on the basis of absorbance at 260 nm and 280 nm using a WPA Biowave DNA spectrophotometer (Isogen Life Science).

Real-time qPCRs. Reactions were performed using an ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). The Sybr green and TaqMan real-time qPCR assays were performed using qPCR MasterMix plus for Sybr green I low 6-carboxy-X-rhodamine (ROX) and qPCR MasterMix plus low ROX, respectively (Eurogentec). The TaqMan probes (Table 1) were labeled (Eurogentec) with the fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (5' end) and Black Hole Quencher (3' end). All reac-

* Corresponding author. Mailing address: Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France. Phone: 33(0)666665536. Fax: 33(0)145171627. E-mail: nicolas.radomski@leesu.enpc.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 17 September 2010.

TABLE 1. Descriptions of the protocols used in this study in order to quantify *Mycobacterium* spp. by qPCR

Parameter ^a	B-HN ^b	Specification in qPCR method ^c :				
		A	B	C	D	E
Combination	NA ^d	With B-HN	Without B-HN	Without B-HN	NA	NA
Chemistry	PCR	TaqMan	TaqMan	TaqMan	Sybr green	TaqMan
F primer	I571R/110F (100 nM)	I571R/110F (100 nM)	110F (300 nM)	110F (900 nM)	pMyc14 (500 nM)	65kDaf2 (1 μM)
R primer	264R (10 nM)	I571R (1 μM)	I571R (300 nM)	I571R (300 nM)	pMyc7 (500 nM)	65kDar3 (1 μM)
Probe	NA	H19R (100 nM)	H19R (100 nM)	H19R (50 nM)	NA	Genus (0.3 μM)
No. of cycles	30	40	40	40	40	50
Denaturation	95°C, 45 s	95°C, 15 s	95°C, 15 s	95°C, 15 s	94°C, 30 s	95°C, 15 s
Annealing	65°C, 30 s	55°C, 20 s	55°C, 20 s	55°C, 20 s	63°C, 15 s	51°C, 15 s
Extension	72°C, 1 min	72°C, 40 s	72°C, 40 s	72°C, 40 s	72°C, 40 s	72°C, 40 s

^a F, forward; R, reverse. Polymerase activation was performed at 95°C for 10 min before all amplification reactions.

^b B-HN, balanced heminested PCR method described by García-Quintanilla et al. (11).

^c Concentrations of forward primers, reverse primers, and probes are displayed in parentheses. qPCR methods A, B, and C are those developed in this study and based on the primers and probe designed by García-Quintanilla et al. (12); qPCR methods D and E are those proposed by Dutil et al. (7) and Tobler et al. (29), respectively.

^d NA, not applicable.

tions were performed in a 25-μl reaction mixture volume in triplicate (2.5 μl of DNA). Determinations of cycle threshold (C_T) were performed by setting the instrument's threshold line at 0.1 ΔRn units (fluorescence gain above the baseline divided by the ROX channel signal).

To assess the performance of the real-time qPCR methods, we calculated the Ef, r², LOQ, Sp, and Ss for each method. Concerning Ef, r², and LOQ, 5-fold dilutions of *Mycobacterium chelonae* strain ATCC 35752^T DNA were prepared in three independent series, in order to achieve relative quantification by qPCR. The Ef was calculated as previously described (26), and the r² was calculated using SDS software (Applied Biosystems). Nonreproducible amplification was not taken into account to estimate the Ef and r². The LOQ was determined by the smallest DNA quantity detected for each assay. DNA quantities were calculated as the number of *M. chelonae* genome equivalents (GE) based upon the *M. chelonae* genome weight (4.4 fg) (9) possessing single copies of the 16S rRNA (32) and *hsp65* (17) genes. Sensitivity was defined as the percentage of *Mycobacterium* species which were detected, and specificity was defined as the percentage of nontarget microorganisms which were not detected according to the collection assessed.

Steps of development. The following 18 forward/reverse primer pairs were selected and tested *in silico* for sensitivity and specificity: SodF/SodR (6), Z261/Z212 (35), recF1/recR1 and recF3/recR2 (1), RPO5V/RPO3V (3), R5/RM3 (16), mycF/mycR (20), 8FPL/1492 (30), 110F/264R (12), 285F/264R (18), F246/R266-267 (2), WuF/WuR (34), 110F/I571R (12), MYC-12/MYC13 (5), GyrBA/GyrBE (4), F119/R184T7 (10), Pri9/Pri8 (4), and Tb11/Tb12 (28). Based on query coverage of the 100 first results, the theoretical specificities and sensitivities of the primers were checked using the GenBank Mega BLAST algorithm. This screening allowed the identification of 8 primer pairs whose *in vitro* specificity was tested using conventional PCR (23). Prior to the PCRs, the absence of PCR inhibitors in extracted DNA was checked using bacterial (8F/I512R) or fungal (ITS1/ITS4) universal primers (8, 33). We then developed a real-time qPCR method (TaqMan) using 5'-exonuclease fluorogenic PCR (12) and the most specific primer pair out of the 8 pairs tested using conventional PCR. We first com-

pared our method with two previously published methods using the same primers, one including a balanced heminested (B-HN) PCR (method A) and one without (method B) (11) (Table 1). The primer titration matrix, primer-probe ratio matrix, and MgCl₂ adjustment matrix were determined based on the results of the comparison and following the manufacturer's recommendations (Eurogentec). The new optimized real-time qPCR method (method C) was compared with the two methods of qPCR (method D [7] and method E [29]) previously described (Table 1).

Primer pair selection. From among the 18 primer pairs initially evaluated, 8 primer pair candidates were selected based on their *in silico* sensitivities and specificities for mycobacterial DNA amplification (data not shown). Among the 8 selected primer pairs, primer pairs 110F/I571R and F119/R184T7 were the most specific toward *Mycobacterium* spp. using conventional PCR (Table 2). F119/R184T7 detected 2 genera of the CNM group (2 of 3 *Nocardia* spp. and 1 of 2 *Rhodococcus* spp.), and 110F/I571R detected only 1 genus of the CNM group (1 of 3 *Corynebacterium* spp.) but also detected 3 unrelated genera (1 of 1 *Flavobacterium* sp., 1 of 5 *Bacillus* spp., and 1 of 4 *Aeromonas* spp.). The amplification products (about 475 bp) from strains not related to *Mycobac-*

TABLE 2. *In vitro* specificity of 8 primer pairs selected from *in silico* studies and tested with conventional PCR amplification of nontarget microorganisms' DNA

Primer pair	No. of amplifications that were ^a :			% Specificity
	High	Low	Negative	
gyrBA/gyrBE	56	1	0	0.0
Z261/Z212	24	23	10	17.5
FSodF/RSodR	21	12	24	42.1
F246/R266267	8	24	25	43.9
MycF/MycR	12	13	32	56.1
Tb11/Tb12	9	3	45	78.9
110F/I571R	1	3	53	93.0
F119/R184T7	3	0	54	94.7

^a High amplification corresponds to PCR product signals as bright as that of the positive control *M. chelonae* ATCC 35752^T, and low amplification corresponds to PCR product signals less bright than that of this positive control or with a different molecular size.

TABLE 3. Comparison of the efficiency, correlation coefficient, limit of quantification, sensitivity, and specificity of *Mycobacterium* isolate quantification by the three methods

Parameter ^a	Value obtained (n = 3) using qPCR method ^b :		
	C	D	E
% efficiency (mean ± SD)	74.3 ± 1.7	74.4 ± 3.3	74.2 ± 2.0
r ² (mean ± SD)	98.6 ± 0.2	98.8 ± 0.0	98.3 ± 0.9
LOQ range (fg)	346–1731	69–346	69–346
LOQ range (GE)	79–393	16–79	16–79
Maximum C _T (mean ± SD)	38.4 ± 0.2	35.0 ± 1.5	38.2 ± 1.4
No. of <i>Mycobacterium</i> species detected (upper LOQ for 30 species tested)	23	30	30
Sensitivity (%)	77	100	100
No. of nontarget genera detected (upper LOQ for 24 genera tested)	0	13	2
Specificity (%)	100	44	91

^ar², correlation coefficient; LOQ, limit of quantification; GE, DNA quantities expressed in number of *M. chelonae* genome equivalents.

^bqPCR method C is the method developed in this study based on the primers and probe designed by Garcia-Quintanilla et al. (12); qPCR methods D and E are the methods proposed by Dutil et al. (7) and Tobler et al. (29), respectively.

terium spp. were less intense than that of the positive control. The intensities of the amplification products from the CNM group were comparable to that of the positive control. Primer pair 110F/1571R seemed the best candidate to develop a specific real-time qPCR method based on TaqMan chemistry, since a probe (H19R) was previously designed to be used with primer pair 110F/1571R (12), whereas the design of a probe between primers F119 and R184T7 would have been difficult because the amplified region is too polymorphic among mycobacteria (10).

Influence of B-HN PCR. According to a previous study (13), the LOQ of method B (393 to 1,967 GE) was higher than that of method A (79 to 393 GE). However, our results also showed that B-HN PCR (method A) does not maintain constant values of Ef (58.7% ± 16.0%) or high values of r² (74.8 ± 0.0) in comparison to those obtained with the single step of method B (Ef = 68.5% ± 1.5% and r² = 96.7 ± 0.0). Consequently, the real-time qPCR method we developed was without B-HN PCR. It was optimized (method C) with regard to the primers, probe, and MgCl₂ concentration (Table 1). Method C reached the same LOQ (Table 3) as was estimated using qPCR with B-HN PCR (method A).

Comparison of real-time qPCR methods. The reproducible values for Ef and r² suggest that real-time qPCR methods C, D, and E detected *M. chelonae* equally well (Table 3). The LOQ values of methods D and E were lower than that of method C (Table 3). Method C detected 23 out of 30 *Mycobacterium* isolates tested even when 50 ng of target DNA was used (data not shown), whereas methods D and E detected all of the isolates (see Table S2 in the supplemental material). However, primers 65Darf2 and 65kDar3 used in method E did not detect isolates of *M. celatum*, *M. heckeshomense*, and *M. leprae* which were not taken into account in our study (29).

None of the 57 nontarget microorganisms were detected by method C, whereas methods D and E yielded PCR products for 13 and 2 different genera, respectively (see Table S3 in the supplemental material). Although Veillette et al. (31) did not detect *Pseudomonas* sp., *Escherichia* sp., or *Staphylococcus* sp. using conventional PCR, 2 of 4 *Staphylococcus* isolates yielded PCR products by qPCR when method D was used (see Table S3 in the supplemental material). The detection limits of conventional PCR, which are known to be lower than those of

real-time qPCR, could explain the poor specificity that we have observed with method D compared to previous conventional PCR results (31). Using primers pMyc7 and pMyc14, Kox et al. (19) observed that *Corynebacterium*, *Nocardia*, and *Rhodococcus* isolates were detected by conventional PCR. The specificity of method D (7) might be improved by using TaqMan chemistry, primer pair pMyc7/pMyc14, and a probe such as the *Mycobacterium* genus probe (pMyc5a) designed by Kox et al. (19). *Rhodococcus* isolates were detected by method E, and 2 out of 4 representative strains of the *Bacillus* genus were detected within the LOQ (see Table S3 in the supplemental material).

To conclude, our new method C is more specific than methods D and E, whereas methods D and E are more sensitive than the method described here (Table 3). Our method appears to be the first real-time qPCR method that is totally specific for the *Mycobacterium* genus. Because low detection limits can be overcome by using a larger quantity of the sampling water, specificity is the critical control point for environmental methods.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences obtained in this study were submitted to GenBank under accession numbers GU265670 to GU265719.

This work was supported by the PIREN-Seine program (<http://www.sisyph.upmc.fr/piren/>), by the OPUR program (<http://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>), and by grant EDP-STE A from the city of Paris.

We are grateful to C. Wichlacz (Centre National de Référence des Mycobactéries), F. Irlinger (UMR782 GMPA), O. Bezier, C. Rousseau (University Paris-Est IUT), P. Boiron, and V. Rodriguez (Centre National de Référence des Nocardioses) for providing strains. We also thank J. O. Falkingham III (Virginia Polytechnic Institute and State University) for his contribution to the paper and the reviewers for their constructive comments.

REFERENCES

- Blackwood, K. S., C. He, J. Gunton, C. Y. Tureme, J. Wolfe, and A. M. Kabani. 2000. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 38:2846–2852.
- Bödinghaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blocker, and E. C. Bottger. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28:1751–1759.
- Cheunoy, W., T. Prammanananb, A. Chairpraserta, and S. Foongladda. 2005. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: two amplified targets, *hsp65* and *rpoB*, for identification of cultured mycobacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51:165–171.
- Dauendorffer, J. N., I. Guillemin, A. Aubry, C. Truffot-Pernot, W. Sougakoff, V. Jarlier, and E. Cambau. 2003. Identification of mycobacterial species by

- PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1311–1315.
5. Dobner, P., K. Feldmann, M. Rifai, T. Loscher, and H. Rinder. 1996. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *J. Clin. Microbiol.* **34**:866–869.
 6. Domenech, P., M. S. Jimenez, M. C. Menendez, T. J. Bull, S. Samper, A. Manrique, and M. J. Garcia. 1997. *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:535–540.
 7. Dutil, S., M. Veillette, A. Mériaux, L. Lazure, J. Barbeau, and C. Duchaine. 2007. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ. Microbiol.* **9**:2836–2843.
 8. Felske, A., H. Rheims, A. Wolterink, E. Stackebrandt, and A. D. L. Akkermans. 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology* **143**:2983–2989.
 9. Fogel, G. B., C. R. Collins, J. Li, and C. F. Brunk. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* **38**:93–113.
 10. Fukushima, M., K. Kakimura, H. Hayashi, H. Nagai, K. Ito, and R. Kawaguchi. 2003. Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2605–2615.
 11. Garcia-Quintanilla, A., L. Garcia, G. Tundo, M. Navarro, J. Gonzalez, and M. T. Jiménez de Anta. 2000. Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1166–1169.
 12. Garcia-Quintanilla, A., J. Gonzalez-Martin, G. Tundo, M. Espasa, and M. T. Jiménez de Anta. 2002. Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4646–4651.
 13. Halliday, C., Q. X. Wu, G. James, and T. Sorrell. 2005. Development of a nested qualitative real-time PCR assay to detect *Aspergillus* species DNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5366–5368.
 14. Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In H. N. Munro and J. B. Allison (ed.), *Mammalian protein metabolism*, vol. 3. Academic Press, New York, NY.
 15. Kazda, J. 2009. The chronology of mycobacteria and the development of mycobacterial ecology, p. 1–11. In J. Kazda, I. Pavlik, J. O. Falkinham III, and K. Hruska (ed.), *The ecology of Mycobacteria: impact on animal's and human's health*, vol. 1. Springer, London, United Kingdom.
 16. Kim, B. J., S. K. Hong, K. H. Lee, Y. J. Yun, E. C. Kim, Y. G. Park, G. H. Bai, and Y. H. Kook. 2004. Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* **42**:1308–1312.
 17. Kim, H., S. H. Kim, T. S. Shim, M. N. Kim, G. H. Bai, Y. G. Park, S. H. Lee, G. T. Chae, C. Y. Cha, Y. H. Kook, and B. J. Kim. 2005. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1649–1656.
 18. Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, A. Meier, A. Wrede, M. Kiekenbeck, F. C. Bange, and E. C. Bottger. 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2882–2889.
 19. Kox, L. F. F., J. van Leeuwen, S. Knijper, H. M. Jansen, and A. H. J. Kolk. 1995. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3225–3233.
 20. Mendum, T. A., B. Z. Chilima, and P. R. Hirsch. 2000. The PCR amplification of nontuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**:189–192.
 21. Pao, C. C., T. S. Yen, J. B. You, J. S. Maa, E. H. Fiss, and C. H. Chang. 1990. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1877–1880.
 22. Radomski, N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moilleron, and F. S. Lucas. 2010. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:3514–3520.
 23. Radomski, N., V. C. Thibault, C. Karoui, K. de Cruz, T. Cochard, C. Gutiérrez, P. Supply, F. Biet, and M. L. Boschirolu. 2010. Genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins, studied by MIRU-VNTR and IS2131 RFLP typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1026–1034.
 24. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
 25. Sanguinetti, M., B. Posteraro, F. Ardito, S. Zanetti, A. Cingolani, L. Sechi, A. de Luca, L. Ortona, and G. Fadda. 1998. Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1530–1533.
 26. Swango, K. L., M. D. Timken, M. D. Chong, and M. R. Buoncrisiani. 2006. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Sci. Int.* **158**:14–26.
 27. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596–1599.
 28. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Botrger, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:175–178.
 29. Tobler, N. E., M. Pfunder, K. Herzog, J. E. Frey, and M. Altwegg. 2006. Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-microarray. *J. Microbiol. Methods* **66**:116–124.
 30. Turenne, C. Y., L. Tschetter, J. Wolfe, and A. Kabani. 2001. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3637–3648.
 31. Veillette, M., P. S. Thorne, T. Gordon, and C. Duchaine. 2004. Six month tracking of microbial growth in a metabworking fluid after system cleaning and recharging. *Ann. Occup. Hyg.* **48**:541–546.
 32. Wallace, R. J., A. Meier, B. A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G. O. Onyi, and E. C. Bottger. 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1676–1681.
 33. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA.
 34. Wu, X., J. Zhang, J. Liang, Y. Lu, H. Li, C. Li, J. Yue, L. Zhang, and Z. Liu. 2007. Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1898–1903.
 35. Zolg, J. W., and S. Philippi-Schulz. 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2801–2812.

Supplementary table 1. *Mycobacterium* spp. strains used to study sensitivity of quantitative real-time PCR methods.

Species	Source (source codification) ^a	Isolate origin
<i>M. arupense</i>	CPS (MC13)	surface water
<i>M. austroafricanum</i>	CPS (MC11)	surface water
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC (25291) ^T	diseased hen, liver
<i>M. bovis</i> BCG	vaccine (1173/P2)	unknown
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	ATCC (19977) ^T	unknown
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	ATCC (35752) ^T	tortoise, tubercle
<i>M. gadium</i>	CIP (105388) ^T	sputum
<i>M. goodii</i>	ATCC (14470) ^T	human, gastric lavage
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	ATCC (6841) ^T	cold abscess
<i>M. insubricum</i>	CPS (MC8)	surface water
<i>M. intracellulare</i>	ATCC (15985) ^T	unknown
<i>M. kansasii</i>	ATCC (12478) ^T	fatal case
<i>M. lentiflavum</i>	CIP (105465) ^T	human, spondylodiscitis
<i>M. llatzerense</i>	CPS (MC10)	surface water
<i>M. marinum</i>	ATCC (927) ^T	salt water fish
<i>M. mucogenicum</i>	CIP (105223) ^T	thyroglossal duct cyst
<i>M. nonchromogenicum</i>	CIP (106811) ^T	soil
<i>M. psychrotolerans</i>	CPS (MC6)	surface water
<i>M. peregrinum</i>	ATCC (14467) ^T	bronchial aspiration of a child
<i>M. porcinum</i>	CPS (MC9)	surface water
<i>M. scrofulaceum</i>	CIP (105416) ^T	cervical lymph node
<i>M. setense</i>	CPS (MC7)	surface water
<i>M. simiae</i>	ATCC (25275) ^T	monkey, <i>Macaca mulatta</i>
<i>M. smegmatis</i>	ATCC (19420) ^T	unknown
<i>M. szulgai</i>	ATCC (35799) ^T	unknown
<i>M. terrae</i>	CIP (104321) ^T	sputum and gastric lavage from human
<i>M. tusciae</i>	CIP (106368)	tap water
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC (25618) ^T	derived from human-lung isolate
<i>M. ulcerans</i>	CPS (CR08085632)	human patient
<i>M. xenopi</i>	ATCC 19250 ^T	adult female toad, <i>Xenopus laevis</i>

^a CPS: Collection de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ^T: type strain, CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France.

Supplementary Table 2. Results of detection by qPCR of about 5 ng DNA of different *Mycobacterium* spp. in triplicate assays. Melting temperature of PCR product ($^{\circ}\text{C} \pm \text{S.D.}$) is displayed in brackets concerning SyberGreen® chemistry method. ND stands for not detected.

Strain codification ^a	Species	Ct values \pm S.D. for each method ^b		
		method C	method D	method E
CPS (MC13)	<i>M. arupense</i>	ND	14.8 \pm 0.4 (82.7 \pm 0.1)	19.4 \pm 0.1
CPS (MC11)	<i>M. austroafricanum</i>	29.8 \pm 0.4	12.1 \pm 0.3 (83.2 \pm 0.2)	16.0 \pm 0.5
ATCC (25291) ^T	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	20.7 \pm 0.2	15.9 \pm 0.1 (83.7 \pm 0.2)	17.7 \pm 0.2
vacaine (1173/P2)	<i>M. bovis</i> BCG	28.3 \pm 0.2	22.2 \pm 0.1 (84.1 \pm 0.1)	24.7 \pm 0.1
ATCC (19977) ^T	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	34.1 \pm 0.4	24.6 \pm 0.1 (83.7 \pm 0.2)	27.3 \pm 0.1
ATCC (35752) ^T	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	24.11 \pm 0.8	17.6 \pm 0.1 (83.1 \pm 0.2)	21.0 \pm 0.1
CIP (105388) ^T	<i>M. goodii</i>	ND	34.2 \pm 0.3 (84.4 \pm 0.2)	28.9 \pm 0.3
ATCC (14470) ^T	<i>M. goodii</i>	21.3 \pm 0.2	16.5 \pm 0.2 (83.5 \pm 0.2)	19.2 \pm 0.5
ATCC (6841) ^T	<i>M. fortituum</i> subsp. <i>fortituum</i>	26.2 \pm 2.7	23.3 \pm 0.1 (83.2 \pm 0.2)	25.4 \pm 0.1
CPS (MC8)	<i>M. intracellulare</i>	25.9 \pm 1.2	16.6 \pm 0.3 (83.7 \pm 0.2)	25.1 \pm 0.1
ATCC (15985) ^T	<i>M. intracellulare</i>	32.5 \pm 0.7	25.0 \pm 0.3 (83.3 \pm 0.2)	26.0 \pm 0.2
ATCC (12478) ^T	<i>M. kansasii</i>	34.7 \pm 0.1	28.8 \pm 0.2 (84.6 \pm 0.2)	31.0 \pm 0.2
CIP (105465) ^T	<i>M. lentiflavum</i>	ND	25.1 \pm 3.0 (83.5 \pm 0.2)	25.4 \pm 1.5
CPS (MC10)	<i>M. lentiflavum</i>	21.2 \pm 0.1	15.1 \pm 0.1 (82.7 \pm 0.1)	19.2 \pm 0.2
ATCC (927) ^T	<i>M. mageritense</i>	23.9 \pm 0.1	19.0 \pm 0.1 (84.0 \pm 0.2)	23.2 \pm 0.1
CIP (105223) ^T	<i>M. marinum</i>	26.5 \pm 0.1	18.0 \pm 0.1 (83.8 \pm 0.1)	21.3 \pm 0.1
CIP (106811) ^T	<i>M. nonchromogenicum</i>	ND	36.7 \pm 1.1 (84.1 \pm 0.1)	33.8 \pm 1.5
CPS (MC6)	<i>M. psychrotolerans</i>	ND	30.7 \pm 0.4 (81.1 \pm 0.2)	27.5 \pm 0.6
ATCC (14467) ^T	<i>M. peregrinum</i>	28.4 \pm 0.5	22.0 \pm 0.2 (83.2 \pm 0.2)	27.0 \pm 0.4
CPS (MC9)	<i>M. porcinum</i>	23.1 \pm 0.1	17.0 \pm 0.1 (83.3 \pm 0.2)	19.4 \pm 0.1
CIP (105416) ^T	<i>M. scrofulaceum</i>	32.0 \pm 0.1	25.0 \pm 0.1 (84.2 \pm 0.2)	28.5 \pm 0.1
CPS (MC7)	<i>M. setense</i>	30.3 \pm 0.1	23.9 \pm 0.3 (82.5 \pm 0.2)	28.4 \pm 0.1
ATCC (25275) ^T	<i>M. simiae</i>	37.3 \pm 0.7	17.1 \pm 0.1 (84.1 \pm 0.4)	19.3 \pm 0.8
ATCC (19420) ^T	<i>M. smegmatis</i>	28.5 \pm 0.1	22.1 \pm 0.1 (84.0 \pm 0.2)	26.5 \pm 0.2
ATCC (35799) ^T	<i>M. szulgai</i>	ND	29.5 \pm 0.3 (83.4 \pm 0.1)	33.1 \pm 0.1
CIP (104321) ^T	<i>M. terrae</i>	23.8 \pm 0.2	18.2 \pm 0.1 (83.4 \pm 0.1)	21.1 \pm 0.1
CIP (106368)	<i>M. tusciae</i>	ND	19.0 \pm 0.1 (83.2 \pm 0.2)	23.0 \pm 0.1
ATCC (25618) ^T	<i>M. tuberculosis</i>	20.8 \pm 0.7	14.4 \pm 0.2 (84.2 \pm 0.2)	17.0 \pm 0.8
CPS (CR080856332)	<i>M. ulcerans</i>	35.8 \pm 0.6	25.1 \pm 0.3 (83.8 \pm 0.4)	27.6 \pm 0.2
ATCC 19250 ^T	<i>M. xenopi</i>	22.1 \pm 0.1	16.8 \pm 0.1 (84.2 \pm 0.2)	19.5 \pm 0.1

^a CPS: Collection de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ^T: type strain; CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; ^b The qPCR method C correspond to the method developed in this study and based on primers and probe designed by Garcia-Quintanilla et al. (J. Clin. Microbiol. 40:4646–4651, 2002), and the qPCR methods D and E correspond to the methods proposed by Dutil et al. (Environ. Microbiol. 9:2836–2843, 2007) and Tobler et al. (J. Microbiol. Methods 66:116–124, 2006), respectively.

Supplementary Table 3. Results of detection by real-time qPCR of about 5 ng DNA of bacteria and fungi isolated from surface water (1), and reference bacteria (2) different from *Mycobacterium* genus in triplicate assays. Melting temperature of PCR product ($^{\circ}\text{C} \pm \text{S.D.}$) is displayed in brackets concerning SyberGreen® chemistry method, < LOQ signify that amplifications are observed in triplicate below limit of quantification. ND stands for not detected.

Strain origin	Strain codification ^a	Genus	Ct values \pm S.D. for each method ^b		
			method C	method D	method E
1	GU265679	<i>Acinetobacter</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265686	<i>Acinetobacter</i> sp.	ND	ND	< LOQ
	GU265678	<i>Aeromonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265680	<i>Aeromonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265706	<i>Aeromonas</i> sp.	ND	< LOQ	ND
	GU265708	<i>Aeromonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265696	<i>Arthro bacter</i> sp.	ND	30.3 \pm 0.1 (81.4 \pm 0.1)	ND
	GU265690	<i>Arthro bacter</i> sp.	ND	31.5 \pm 0.2 (81.6 \pm 0.2)	ND
	GU265692	<i>Arthro bacter</i> sp.	ND	31.6 \pm 0.3 (82.1 \pm 0.1)	ND
	GU265699	<i>Arthro bacter</i> sp.	ND	34.1 \pm 0.2 (82.2 \pm 0.2)	ND
	GU265713	<i>Aspergillus</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265674	<i>Bacillus</i> sp.	ND	< LOQ	ND
	GU265684	<i>Bacillus</i> sp.	ND	32.3 \pm 0.2 (83.5 \pm 0.2)	36.4 \pm 0.2
	GU265685	<i>Bacillus</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265689	<i>Bacillus</i> sp.	ND	36.5 \pm 1.2 (83.3 \pm 0.8)	39.0 \pm 1.6
	GU265693	<i>Brevundimonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265704	<i>Escherishia</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265705	<i>Escherishia</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265688	<i>Flavobacterium</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265714	<i>Kocuria</i> sp.	ND	30.5 \pm 0.1 (82.0 \pm 0.2)	ND
	GU265700	<i>Leuciercia</i> sp.	ND	ND	ND
GU265697	<i>Leucobacter</i> sp.	ND	32.3 \pm 0.1 (82.1 \pm 0.1)	ND	
GU265698	<i>Microbacterium</i> sp.	ND	ND	ND	
GU265672	<i>Micrococcus</i> sp.	ND	32.2 \pm 0.1 (82.1 \pm 0.1)	ND	
GU265682	<i>Micrococcus</i> sp.	ND	29.2 \pm 0.2 (82.0 \pm 0.2)	ND	
GU265694	<i>Micrococcus</i> sp.	ND	35.9 \pm 1.2 (82.1 \pm 0.1)	ND	
GU265719	<i>Micrococcus</i> sp.	ND	32.7 \pm 0.2 (82.0 \pm 0.2)	ND	
GU265716	<i>Micrococcus</i> sp.	ND	32.9 \pm 0.1 (82.1 \pm 0.2)	ND	
GU265711	<i>Penicillium</i> sp.	ND	ND	ND	

^a Strains isolated from surface water are codified by GenBank accession number and reference strains are codified by collection number; [†] type strain. ^b The qPCR method C correspond to the method developed in this study and based on primers and probe designed by Garcia-Quintanilla et al. (J. Clin. Microbiol. 40:4646–4651, 2002), and the qPCR methods D and E correspond to the methods proposed by Dutil et al. (Environ. Microbiol. 9:2836–2843, 2007) and Tobler et al. (J. Microbiol. Methods 66:116–124, 2006), respectively.

Supplementary Table 3 (Suite). Results of detection by real-time qPCR of about 5 ng DNA of bacteria and fungi isolated from surface water (1), and reference bacteria (2) different from *Mycobacterium* genus in triplicate assays. Melting temperature of PCR product ($^{\circ}\text{C} \pm \text{S.D.}$) is displayed in brackets concerning SyberGreen® chemistry method, < LOQ signify that amplifications are observed in triplicate below limit of quantification. ND stands for not detected.

Strain origin	Strain codification ^a	Genus	Ct values \pm S.D. for each method ^b		
			method C	method D	method E
1	GU265711	<i>Penttilium</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265670	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	< LOQ	ND
	GU265671	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265673	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265676	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265677	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265683	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265687	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	< LOQ
	GU265701	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265702	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265707	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265709	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265712	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	< LOQ	ND
	GU265695	<i>Rhodococcus</i> sp.	ND	25.1 \pm 0.2 (83.4 \pm 0.1)	27.9 \pm 0.6
	GU265717	<i>Rhodococcus</i> sp.	ND	25.6 \pm 0.1 (82.8 \pm 0.2)	29.0 \pm 0.3
	GU265675	<i>Staphylococcus</i> sp.	ND	ND	ND
	GU265681	<i>Staphylococcus</i> sp.	ND	35.7 \pm 1.9 (83.3 \pm 0.8)	< LOQ
GU265715	<i>Staphylococcus</i> sp.	ND	35.8 \pm 0.6 (84.6 \pm 0.1)	ND	
GU265703	<i>Serratia</i> sp.	ND	34.8 \pm 0.8 (83.3 \pm 0.2)	< LOQ	
GU265691	<i>Solibacillus</i> sp.	ND	37.1 \pm 1.9 (82.9 \pm 0.7)	ND	
GU265718	<i>Streptomyces</i> sp.	ND	31.1 \pm 0.1 (84.2 \pm 0.1)	ND	
GU265710	<i>Trichoderma</i> sp.	ND	ND	ND	
2	ATCC 13032 ^T	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ND	< LOQ	ND
	ATCC 6871 ^T	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ND	33.0 \pm 0.2 (82.9 \pm 0.1)	ND
	ATCC 10700 ^T	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	ND	31.2 \pm 0.2 (82.0 \pm 0.2)	ND
	ATCC 43504 ^T	<i>Helicobacter pylori</i>	ND	28.8 \pm 0.1 (81.8 \pm 0.2)	ND
	DSM 44546 ^T	<i>Nocardia cerraoidensis</i>	ND	28.0 \pm 0.2 (82.6 \pm 0.2)	ND
	IFM 10152	<i>Nocardia farcinica</i>	ND	30.8 \pm 0.5 (81.5 \pm 0.1)	ND
	DSM 44490 ^T	<i>Nocardia amnielens</i>	ND	22.6 \pm 0.6 (81.5 \pm 0.1)	ND

^a Strains isolated from surface water are codified by GenBank accession number and reference strains are codified by collection number; ^T type strain. ^b The qPCR method C correspond to the method developed in this study and based on primers and probe designed by Garcia-Quintanilla et al. (J. Clin. Microbiol. 40:4646–4651, 2002), and the qPCR methods D and E correspond to the methods proposed by Dutil et al. (Environ. Microbiol. 9:2836–2843, 2007) and Tobler et al. (J. Microbiol. Methods 66:116–124, 2006), respectively.

II.3 / Méthode efficace d'extraction de l'ADN en vue d'une quantification par PCR en temps-réel de *Mycobacterium* spp. dans l'eau de surface (soumis en octobre 2010 à *Canadian Journal of Microbiology*)

Effective DNA extraction method for quantification of *Mycobacterium* spp. in surface water by real-time qPCR

Nicolas Radomski^{1*}, Emmanuelle Cambau^{2,3}, Laurent Moulin⁴, Sophie Haenn⁴, Régis Moilleron¹, and Françoise S. Lucas¹

Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France¹; AP-HP, Hôpital Charles Foix, FR 94205 Ivry-sur-Seine, France²; AP-HP, Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, Hôpital Saint Louis, FR 75475 Paris, France³; Eau de Paris, Direction Recherche et Développement Qualité de l'Eau (DRDQE), 33 avenue Jean Jaurès, FR 94200 Ivry sur Seine, France⁴

In order to apply a new real-time qPCR method allowing to quantify *Mycobacterium* spp. in water, we compared the DNA purity as well as the recovery of total and mycobacterial DNA among six DNA extraction methods based on combinations of three lysis procedures (enzymatic lysis, mechanical lysis, and combination of both) and two purification procedures (hexadecyltrimethylammonium bromide-NaCl: NaCl-CTAB, and inhibitor removal technology: IRT). No significant difference of the purity was observed between mechanical lysis or enzymatic lysis combined with CTAB-NaCl procedure and mechanical lysis combined with IRT procedure ($P = 0.202$), whereas the recoveries of total DNA and mycobacterial DNA were significantly higher ($P < 0.0005$ and $P < 0.00001$, respectively) using the enzymatic lysis combined to the CTAB-NaCl procedure than using the other methods. With a view to quantify nontuberculous mycobacteria in environmental water samples, the enzymatic lysis and CTAB-NaCl procedure was the most effective combination of mycobacterial DNA extraction.

Key words: Quantification; *Mycobacterium*; surface water; real-time qPCR; DNA extraction

Environmental exposure, especially through water, is the main origin for some human infections caused by nontuberculous mycobacteria (NTM) (5, 20). Because NTM are emerging pathogens for humans and animals, it is important to identify their environmental sources in fresh water ecosystems. Since current bacteriological methods of NTM isolation from surface water cannot be used as reliable quantitative tools (22), a real-time qPCR method was recently developed in order to specifically quantify *Mycobacterium* spp. in surface water (23). The limit of quantification of any PCR assay depends on the cells lysis and on the purification of DNA which must be PCR inhibitors free. Concerning mycobacteria detection, extraction procedure is especially crucial because mycobacteria requires intensive extraction due to the robustness of their cell wall (12). Moreover, detection of mycobacteria in surface water may also be impaired by organic and inorganic compounds which could inhibit the Taq polymerase reaction and consequently have to be removed during the extraction procedure (21). It is therefore important to determine an suitable extraction method of mycobacterial DNA from environmental samples in order to quantify mycobacteria efficiently by real-time qPCR. Among the published methods of mycobacterial DNA extraction (9), the cell wall is often lysed by enzymatic digestion using lysozyme and proteinase K (1, 12, 30) and/or by mechanical disruption such as bead-beating (4, 19, 29). Concerning mycobacterial DNA purification, the chemical procedure using hexadecyltrimethylammonium bromide-NaCl (CTAB/NaCl) is often applied on mycobacterial isolates or clinical samples (2, 8, 30) because it allows to remove cell wall debris, polysaccharides, and remaining proteins by selective precipitation with CTAB (16). Recently, several studies using procedures based on inhibitor removal technology® (IRT) were used in order to purify genomic DNA from environmental samples eliminating humic acids which are potential PCR-inhibitors (13, 26, 28).

*Correspondence: Nicolas Radomski, Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France ; email: nicolas.radomski@leesu.enpc.fr ; tel: +33(0)666665536 ; fax: +33(0)145171627

However, few studies focused on extraction efficiency and DNA quality which is crucial for real-time qPCR assays, especially for environmental samples. The aim of this study was to choose the most effective mycobacterial DNA extraction method in order to quantify *Mycobacterium* spp. in surface water by real-time qPCR. Using a recently described real-time qPCR protocol (23), we compared the recovery of mycobacterial DNA from surface water samples using enzymatic lysis procedures (lysozyme and proteinase K) and/or mechanical disruption procedures (bead-beating), combined with purification procedures based on CTAB/NaCl or IRT (MoBio).

MATERIALS and METHODS

Sampling of surface water and artificial inoculation. Surface water samples were collected in six replicates between July 2008 and March 2009 from the Seine River (France) at water supply catchment sites near drinking water plants. For each sample, 1 liter was collected in a sterile glass bottle (Schott Duran®). Samples were cooled to 4°C and transported to the laboratory within 6 h and were immediately processed upon return to the laboratory. Solids in the water sample were concentrated by centrifugation (7000×g, 15 min, 4°C) and the pellet was resuspended in 9 mL of discarded supernatant before artificial inoculation. Without knowing the cell loss rates of each DNA extraction method, and in order to quantify target by real-time qPCR after DNA extraction procedures, we chose to apply a high density of NTM, which does not reflect real density levels in surface waters. We inoculated water samples with the rapid-growing reference strain *M. chelonae* ATCC 35752 which is frequently isolated from surface water and causes human infections of aquatic origin. Artificial inoculation consisted of adding a 1 mL suspension containing about 10⁶ CFU into the 9 mL of concentrated water in order to constitute a concentrated surface water sample presenting potential PCR inhibitors and containing high level of NTM. In order to prepare the inoculum, the reference strain was cultivated onto Löwenstein-Jensen (Bio-Rad), dissolved in API AUX medium (BioMérieux), and diluted appropriately with sterilized water using McFarland Ladder (3.0 McFarland density corresponding to 10⁸ CFU/mL). Cell concentration of this artificial inoculation solution was checked in triplicate assays by 10-fold dilution series in sterile water, inoculations on Middlebrook 7H11, and incubations at 30°C. Before DNA extractions, inoculated samples were centrifuged (7000×g, 15 min, 4°C) and the supernatants were discarded in order to extract DNA from pellets.

RADOMSKI ET AL.

DNA extraction methods. Six combinations of cell wall lysis and DNA purification procedures were compared: enzymatic digestion and/or mechanical disruption, combined with CTAB/NaCl purification or Inhibitor Removal Technology® (IRT). Briefly, enzymatic digestion of cell wall, named method A, consisted of lysozyme digestion (Sigma-Aldrich) at final concentration of 1 mg/mL (37°C, 1 h, 650 rpm agitation), followed by sodium dodecyl sulfate (SDS) and proteinase K treatment (Roche Diagnostics GmbH) at final concentration of 1.2% and 0.2 mg/mL, respectively (65°C, 10 min, 650 rpm). Mechanical disruption of the cell wall by bead-beating, named method B, was performed according to the manufacturer recommendations with SDS and using the Power Soil Kit (Mo Bio Laboratories). PowerBead tubes (Mo Bio Laboratories) were fixed on a flat-bed vortex pad with tape, and mixed at 6.5 m/s for 10 min. In order to respect the recommendation of the manufacturer (Mo Bio Laboratories), the enzymatic digestion procedure combined with the bead-beating procedure, named procedure A+B, was performed using the same final volume that both procedures used independently (810 µL). These three lysis procedures (A, B, A+B) were combined with the two purification procedures using CTAB/NaCl or IRT. Concerning the CTAB/NaCl procedure, named C, NaCl and CTAB were added to the sample at final concentrations of 0.8 M and 0.6%, respectively. After incubation at 65°C for 10 min under agitation (650 rpm), four phenol: chlorophorm: isoamyl alcohol (25: 24: 1) purification step were conducted (v:v). The aqueous phase was then recovered using Phase Lock Gels™ (5 Prime) and DNA was precipitated with isopropanol (v/v), and concentrated by centrifugation (10000 ×g, 15 min). IRT procedure, named D, was performed using the Power Soil Kit and following manufacturer recommendations (Mo Bio Laboratories). DNA was eluted from the Mo Bio Silica membrane and DNA was precipitated with 5 µL of NaCl at 5 M and 200 µL of 100% ethanol, and concentrated by centrifugation (10000 ×g, 15 min) according to manufacturer recommendations (Mo Bio Laboratories). DNA pellets obtained from each of the six methods (A+C, B+C, A+B+C, A+D, B+D, A+B+D) were washed with 200 µL of 70% cold ethanol. After evaporation of ethanol at 37°C, DNA was resuspended in 10 µL of TE buffer (10 mM Tris pH 7.6; 1 mM EDTA).

Comparison factors of DNA extraction methods. Concentration and purity of total DNA was estimated at 260 nm and 280 nm using a spectrophotometer WPA Biowave DNA (Isogen Life Science). Concentration of mycobacterial DNA was measured by real-time qPCR using the method recently described by Radomski et al. (23). Briefly, reaction mixes included 6-carboxy-X-rhodamine (ROX) passive reference dye for normalization of data on ABI 7500 real-time qPCR system with SDS software (Applied Biosystems Inc, Lincoln Centre Drive Foster City, USA). TaqMan® real-time qPCR assays were performed using qPCR MasterMix Plus Low ROX (Eurogentec). The probes were labeled with the fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein on the 5' end as the reporter (R), and Black Hole Quencher on the 3' end as the quencher (Eurogentec).

Mycobacterial DNA extraction for quantitative PCR

All reactions were performed in 25 µL reaction volume (5 µL of DNA) with a 1X buffer containing HotGoldStar Taq polymerase, 5 mM of MgCl₂ corresponding to stringency conditions (Eurogentec), 900 nM of forward primer (110F: 5'-CCTGGGAAACTGGGTCTAAT3'), 300 nM of reverse primer (I571R: 5'-CGCACGCTCACAGTTA-3') and 50 nM of probe (H19R: 5'-TTTCACGAACAACGCGACAAACT-3'). After HotGoldStar Taq polymerase activation (95°C, 10 min), 40 cycles at 95°C for 15 s, annealing at 55°C for 20 s and extension at 72°C for 40 s were applied, and determination of cycle threshold (Ct) were performed by the instrument setting threshold line at 0.1 ΔRn units (fluorescence gain above the baseline divided by the signal in the ROX channel). In order to achieve spectrometric relative quantification by real-time qPCR, a standard curve was prepared using *M. chelonae* ATCC 35752^T strain DNA as previously described (23), and DNA concentration was measured using a spectrophotometer WPA Biowave DNA (Isogen Life Science). Five-fold dilutions of this *M. chelonae* DNA were prepared using TE buffer 1X in triplicate independent series, and genome equivalent was estimated according to the size of the *M. chelonae* ATCC 35752^T genome which measure approximately 4 Mbp (6, 31), corresponding to 2.6x10⁹ mol wt (10). The calculation of genome equivalent was based upon the size of 1 genome of *M. chelonae* which weights about 4.4 fg and contains a single copy of 16S rDNA (32, 33). The efficiency, the correlation coefficient, and the limit of quantification of the real-time qPCR method were calculated as previously described (23). Negative controls were performed in triplicate with TE buffer 1X instead of DNA. DNA extractions (pure and 10-fold diluted in TE buffer) were analyzed by real-time qPCR. Statistical analyses of data were carried out using JMP 7 software (Statistical Analysis System).

RESULTS and DISCUSSION

Real-time qPCR is a fast and sensitive method allowing to quantify mycobacteria, but need to be performed after efficient DNA extraction concerning environmental sample analyses. To our knowledge, this comparison of six different DNA extraction protocols is the most comprehensive study determining recovery of mycobacterial DNA from surface water samples. We compared the six extraction procedures based on their ability to retrieve the highest DNA quantity, with the highest repeatability and quality which would provide templates suitable for real-time qPCR. The method combining enzymatic lysis together with CTAB/NaCl procedure (A+C) was the most effective method with the highest DNA recovery and the highest DNA purity in the 6 replicates (Table 1). Only the procedures A+C, B+C, B+D or A+B+D recovered total DNA amounts above the quantification limit in at least five of the six replicates (Table 1). Using the methods combining enzymatic lysis with IRT (methods A+D), or the enzymatic lysis and bead-beating with CTAB/NaCl procedure (A+B+C), DNA was measured above the quantification limit in only one or two replicates. So for the rest of the discussion on total DNA we will focus on methods A+C, B+C, B+D and A+B+D.

TABLE 1. Purity and recovery of total DNA, extracted in six replicates (n=36) from surface water samples by methods using enzymatic digestion with lysozyme and proteinase K (A) and/or mechanical disruption by bead-beating (B), combined to CTAB/NaCl procedure (C) or Inhibitor Removal Technology® (D) in order to quantify *Mycobacterium* spp. by real-time PCR

Extraction method		Number of quantitative assays	Total extracted DNA	
Lysis procedure	Purification procedure		Mean of ratio (260nm/280nm ± SD ^b)	Mean extracted DNA (µg/ml ± SD ^b)
A	C	6	1.88 ± 0.19	318 ± 228
A	D	1	2.66	20
B	C	6	1.91 ± 0.15	84 ± 44
B	D	6	1.77 ± 0.04	101 ± 41
A+B	C	1	0.74	123
A+B	D	5	1.45 ± 0.28	14 ± 8

^a quantitative assays corresponds to the assays with a concentration above the limit of quantification of the spectrophotometer; ^b SD: standard deviation of the quantitative assays

RADOMSKI ET AL.

The purity (based on 260/280 nm ratios) was higher using A+C, B+C and B+D protocols than A+C+D protocol (Table 1). The bead-beating lysis or enzymatic lysis combined with CTAB/NaCl procedure (B+C and A+C), and bead-beating lysis combined with IRT procedure (B+D), allowed to obtain the purer DNA (A+C: 1.88 ± 0.19 ; B+C: 1.91 ± 0.15 and B+D: 1.77 ± 0.04) than bead-beating lysis and enzymatic lysis combined with IRT procedure (A+B+D: 1.45 ± 0.28). Concerning extracted DNA which were quantify by spectrophotometer in the 6 replicates (A+C, B+C and B+D), significant differences of the purity were not observed neither between bead-beating lysis or enzymatic lysis combined with CTAB/NaCl procedure (B+C and A+C), and bead-beating lysis combined with IRT procedure (B+D) ($F = 1.78$, $df = 2$, $n = 18$, and $P = 0.202$, as determined by analysis of variance), nor between bead-beating lysis and enzymatic lysis combined with CTAB/NaCl procedure (B+C and A+C) ($F = 0.15$, $df = 1$, $n = 12$, and $P = 0.704$, as determined by analysis of variance).

The total DNA recovery was significantly higher ($\chi^2 = 28.33$, $df = 5$, $n = 36$, and $P < 0.0001$, as determined by Wilcoxon test) using the method A+C ($318 \pm 228 \mu\text{g/mL}$) than using the methods B+C ($84 \pm 44 \mu\text{g/mL}$), B+D ($101 \pm 41 \mu\text{g/mL}$), A+C+D ($14 \pm 8 \mu\text{g/mL}$), and the other methods which extracted DNA was quantify by spectrophotometer only in one replicates (A+D and A+B+C) (Table 1). However, the results were highly variable among the 6 replicates for A+C and B+C methods compared to B+D and A+C+D (Table 1). IRT is a purification method based on a commercial column, which allow to obtain purest DNA extracts compared to classical phenol-based extraction methods (27). The kits using IRT procedure present the advantage of avoiding using of dangerous chemicals (such as phenol), but generally result in a considerable loss of DNA (either due to poor lysis or DNA loss during the purification procedures). Our results showed that combination of the enzymatic lysis, which was performed with SDS (A+B+D), with the bead-beating procedure was more effective than the procedure using this mechanical disruption procedure alone (B+D) or the enzymatic lysis alone (A+D). These results are in accordance with a previous study of microbial DNA extraction procedures from fecal samples (34) which observed that addition of SDS to the beat-beating procedure following by purification based on commercial column, allowed to recovery more DNA than using mechanical cell lysis procedure alone. Concerning the use of CTAB/NaCl purification procedure, the enzymatic lyses (A+C: $318 \pm 228 \mu\text{g/mL}$) allowed to recover more DNA than using bead-beating alone (B+C: $84 \pm 44 \mu\text{g/mL}$) or enzymatic lyses combined with bead-beating (A+B+C: $123 \mu\text{g/mL}$ only for one of the 6 replicates). Consequently, results about CTAB/NaCl purification shows that, concerning cell lyse, bead-beating procedure (B) is less efficient than the enzymatic lysis (A), and may damage DNA when it is used after enzymatic lyses (B+A). The quality of DNA does not include only the purity but also the DNA damages.

TABLE 2. Mycobacterial DNA, extracted in six replicates ($n=36$) from surface water samples by methods using enzymatic digestion with lysozyme and proteinase K (A) and/or mechanical disruption by bead-beating (B), combined to CTAB/NaCl procedure (C) or Inhibitor Removal Technology® (D) and quantify by real-time PCR

Extraction method		Number of quantitative assays ^a	Dilution factor of positive assays ^b	Mycobacterial extracted DNA ^c	
Lysis procedure	Purification procedure			Mean cycle threshold (cycle) \pm SD ^d	Mean copy (\log_{10} copy) \pm SD ^d
A	C	6	10	30.57 ± 2.79	4.88 ± 0.74
A	D	0	1	ND	ND
B	C	0	1	ND	ND
B	D	2	1	33.98 ± 2.99	4.02 ± 0.77
A+B	C	6	1	33.54 ± 1.33	3.16 ± 0.34
A+B	D	0	1	ND	ND

^a quantitative assays corresponds to the assays with a concentration above the limit of quantification of real-time qPCR method (250 copy per liter of water); ^b N/A: not applicable; ^c ND: not determined; ^d SD: standard deviation of the quantitative assays

Mycobacterial DNA extraction for quantitative PCR

A comparative study of DNA extraction protocols from different environmental samples observed that bead beating procedure strongly sheared the DNA, which may compromise the cloning of DNA fragments (7). Consequently, bead-beating may also compromise the hybridization of the probe during the quantification by real-time qPCR based on TaqMan™ probe.

In accordance with our previous study (23), efficiency of our real-time qPCR method was evaluated at $81.4 \pm 4.6\%$ based on the slopes of the calibration curves. The correlation coefficient of the calibration curves, and the limit of quantification of the real-time qPCR were estimated at $99.54 \pm 0.35\%$, and 125 genome copy in the extracted DNA (corresponding to a cycle threshold of 36.33 ± 1.17), respectively. After check on the absence of amplification in the negative controls, and because of this high and stable correlation coefficient, we assumed that reliable quantifications of *Mycobacterium* spp. could be performed using this method in order to compare mycobacterial DNA recovery of the six DNA extraction methods. Except for the rapid growing mycobacteria *M. chelonae*, *M. abscessus* and *M. alvei* which contain one copy of 16S rDNA (14, 25), and the slow growing mycobacteria *M. terrae* and *M. celatum* which contain two copies of 16S rDNA (17, 24), the other rapid and slow growing mycobacteria, already studied, contain generally two and one copy of 16S rDNA, respectively. Consequently, the use of rapid growing NTM containing one 16S rDNA copy as *M. chelonae*, in order to achieve spectrometric relative quantification by real-time qPCR, could overvalue a sample mainly constituted of rapid growing mycobacteria containing two 16S rDNA copies, and in reverse, the use of a NTM containing two 16S rDNA copies could undervalue a sample mainly constituted of slow growing mycobacteria containing one 16S rDNA copy.

In accordance with the observations of the recovered total DNA (Table 1) and all lysis procedures taken into account, the CTAB/NaCl procedure was more efficient than the IRT, because only two DNA extractions were positive to *Mycobacterium* using IRT, compared to twelve using CTAB/NaCl procedure (Table 2). Consequently, and maybe because of the low concentrations of recovered DNA (Table 1), this IRT based on silicate column does not seem adequate in order to quantify *Mycobacterium* spp. in surface water by real-time qPCR. This observation is in disagreement with the optimization study of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* quantification in soil samples by real-time qPCR (3), which recommends a DNA extraction method based on heat lysis procedure with proteinase K and detergents following by a purification on silicate column (Qbiogene's Fast® DNA Spin kit). Nevertheless this study compared only three nucleic acid extraction techniques (3), against six in the present study, and did not take into account the CTAB/NaCl method, though this purification method was successfully applied in environmental samples in order to detect *M. avium* subsp. *paratuberculosis* by real-time qPCR (18).

RADOMSKI ET AL.

Concerning the methods of mycobacterial DNA extraction using CTAB/NaCl purification procedure (Table 1: A+C and B+C), our results about mycobacterial DNA recovery (Table 2), showed that the use of enzymatic lysis alone (A+C: $4.88 \pm 0.74 \log_{10}$ copy) allows to recover higher mycobacterial DNA than bead-beating used alone (B+C). This observation could be explained by the fact that bead-beating alone presents a low efficacy toward the lysis of mycobacterial cell wall which is known for its robustness (12). But, as suggested above, bead-beating may also compromise the hybridation of the probe during the quantification by real-time qPCR based on TaqMan™ probes, as it has been already observed during a comparative study of DNA extraction protocols which observed that bead-beating procedure strongly sheared the DNA, and consequently may compromise the cloning of gene-sized fragments hybridation (7).

Our results are in complete accordance with a recent study of Mitchell and Takacs-Vesbach about total community DNA preservation and extraction from various thermal environments, which recommend also the CTAB/NaCl purification procedure in comparison with Bio Soil DNA Purification kit and other combinations of procedures (15). Nevertheless, our results and those of Mitchell and Takacs-Vesbach (15) are in discordance with results of another recent study of acetic acid bacteria in wine and vinegar characterized by real time PCR which did not find difference between CTAB/NaCl procedure and the commercial Power Soil DNA Isolation kit (11). Moreover, our results are in partial accordance with an optimization study of DNA preparation from pathogenic and environmental mycobacteria (12), which shows also that the procedure using purification columns does not allow to recover high mycobacterial DNA. In agreement with Käser et al (12) we also recommend to use pretreatment with lysozyme following by proteinase K treatment combined to SDS, followed by phenol-chloroform purification. However, contrary to our study, Käser et al. (12) recommended the addition of a mechanical disruption after the enzymatic lysis, and preferred ethanol precipitation to isopropanol precipitation. Nevertheless, it is difficult to compare these points between both studies, because the study of Käser et al (12) did not take into account of the CTAB/NaCl procedures (16), and our study did not take into account of the precipitation type. To summarize, these two critical points (interest of CTAB/NaCl component versus interest of disruption procedure, and interest of ethanol precipitation versus isopropanol precipitation) are the essential factors whose combination must be studied in the future in order to improve the detection and quantification of the mycobacteria in environmental samples. Moreover, in order to check the purity of the extracted genomic DNA, the study of Käser et al (12) used PCR primer pairs targeting *Mycobacterium* spp., which were designed *in silico* but whose sensitivity toward other microorganisms and specificity toward different mycobacteria species, have never been checked *in vitro*. Because inter-genus specificity and intra-genus sensitivity are crucial factors concerning the detection and the quantification of pathogenic microorganisms, we recommend the use of analytical tools which have been checked *in vitro*. Indeed, estimation of specificity using bioinformatics tools only is not sufficient in order to develop a specific analytical tool (23).

Interestingly, concerning use of CTAB/NaCl purification procedure, it was possible to quantify mycobacteria by real-time qPCR in all six replicates (Table 2), when total DNA (Table 1) was pure and quantified by spectrophotometer (A+C), and also when total DNA was quantified by spectrophotometer only in one extracted DNA over six (A+B+C). This observation could be explain by the fact that quantification limit of real-time qPCR, which was in this study estimated at 125 genome copies in extracted DNA (about 550 fg), is lower than quantification limit of the spectrophotometer, and that DNA extractions which were not quantified by spectrophotometer (Table 1: A+B) may be pure enough and allow real-time qPCR amplification.

Mycobacterial cell numbers in artificially inoculated samples were estimated using culture method at about $6.29 \log_{10}$ CFU \pm 0.04 per liter of water. Estimation of recovered mycobacterial DNA by

Mycobacterial DNA extraction for quantitative PCR

real-time qPCR shows that all the studied DNA extraction methods are not totally efficient, because the estimated recovered genome copies were always estimated below the artificially inoculated cells quantity (Table 2). Concerning the extraction method using enzymatic lyses and CTAB/NaCl purification (A+C) which recovered the most mycobacterial DNA ($4.88 \pm 0.74 \log_{10}$ copy), the mycobacterial DNA recovery ranged from 1% to 33% compared to bacteriological estimation of *M. chelonae* cell number added in each samples.

Based on comparison of several procedures, a method for mycobacterial DNA extraction from environment has been proposed in order to perform quantification by real-time qPCR. This DNA extraction method is constituted of enzymatic lysis using lysozyme, proteinase K and SDS treatments, followed by purification steps using CTAB/NaCl and phenol/chloroform/isoamyl alcohol. Moreover, we recommend the use of methods whose inter-genus specificity and intra-genus sensitivity have been previously checked *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by two research programs: PIREN-Seine (<http://www.sisyph.jussieu.fr/internet/piren/>) and OPUR (<http://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>), and by a STEA grant from the city of Paris. We thank our colleagues especially Fanny Richard from Eau de Paris laboratories for her help in the experiments. We thank also Justin Tanner from Virginia Polytechnic Institute and States University for his contribution to the writing, and reviewers for their constructive comments and improvement of this paper.

REFERENCES

1. Adékambi, T., P. Colson, and M. Drancourt. 2003. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5699-5708.
2. Amaro, A., E. Duarte, A. Amado, H. Ferronha, and A. Botelho. 2008. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Let. Appl. Microbiol.* **47**:8-11.
3. Cook, K. L., and J. S. Britt. 2007. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* **69**:154-160.
4. de Boer, R., R. Peters, S. Gierveld, T. Schuurman, M. Kooistra-Smid, and P. Savelkoul. 2010. Improved detection of microbial DNA after bead-beating before DNA isolation. *J. Microbiol. Methods* **80**:209-211.
5. Falkingham, J. O. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:763-7.
6. Fogel, G. B., C. R. Collins, J. Li, and C. F. Brunk. 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* **38**:93-113.
7. Gabor, E. M., E. J. de Vries, and D. B. Janssen. 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**:153-163.
8. Honore, S., J. P. Vincensini, L. Hocqueloux, M. E. Noguera, D. Farge, P. Lagrange, and J. L. Herrmann. 2001. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction assay on peripheral blood mononuclear cells from patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *Int. J. Lung Dis.* **5**:754-762.
9. Hosek, J., P. Svastova, M. Moravkova, I. Pavlik, and M. Bartos. 2006. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: A review. *Veterinari Medinina* **51**:180-192.
10. Imaeda, T., G. Broslawski, and S. Imaeda. 1988. Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blot hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:151-156.
11. Jara, C., E. Mateo, J. M. Guillamón, M. J. Torija, and A. Mas. 2008. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* **128**:336-341.
12. Käser, M., M. T. Ruf, J. Hauser, L. Marsollier, and G. Pluschke. 2009. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:414-418.
13. Lloyd, K. G., B. J. MacGregor, and A. Teske. 2009. Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: Maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**:143-151.
14. Menendez, M. C., M. J. Garcia, M. C. Navarro, J. A. Gonzalez-y-Merchand, S. Rivera-Gutierrez, L. Garcia-Sanchez, and A. Cox. 2002. Characterization of an rRNA Operon (*rnB*) of *Mycobacterium fortuitum*

- and other mycobacterial species: Implications for the classification of mycobacteria. *J. Bacteriol.* **194**:1078-1088.
15. Mitchell, K. R., and C. D. Takacs-Vesbach. 2008. A comparison of methods for total community DNA preservation and extraction from various thermal environments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**:1139–1147.
 16. Murray, M. G., and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**:4321-4326.
 17. Ninet, B., M. Monod, S. Emler, J. Pawlowski, C. Metral, P. Rohner, R. Auckenthaler, and B. Hirschel. 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2531-2536.
 18. O'Mahony, J., and H. Colin. 2002. A real time PCR assay for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *J. Microbiol. Methods* **51**:283-293.
 19. Pickup, R. W., G. Rhodes, S. Arnott, K. Sidi-Boumedine, T. J. Bull, A. Weightman, M. Hurley, and J. Hermon-Taylor. 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.
 20. Primm, T., C. A. Lucero, and J. O. Falkinham. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:98-106.
 21. Queiroz, A. P. S., F. M. Santos, A. Sassaroli, C. M. Harsi, T. A. Monezi, and D. U. Mehnert. 2001. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4614-4618.
 22. Radomski, N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moïlleron, and F. S. Lucas. 2010. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:3514–3520.
 23. Radomski, N., F. S. Lucas, R. Moïlleron, E. Cambau, S. Haenn, and L. Moulin. 2010. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7348-7351.
 24. Reischl, U., K. Feldmann, L. Naumann, B. J. Gaugler, B. Ninet, B. Hirschel, and S. Emler. 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1761-1764.
 25. Ripoll, F., S. Pasek, C. Schenowitz, C. Dossat, V. Barbe, M. Rottman, E. Macheras, B. Heym, J. L. Herrmann, M. Daffé, R. Brosch, J. Risler, and J. L. Gaillard. 2009. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **4**:1-12.
 26. Robeson, M. S., E. K. Costello, K. R. Freeman, J. Whiting, B. Adams, A. P. Martin, and S. K. Schmidt. 2009. Environmental DNA sequencing primers for eutardigrades and bdelloid rotifers. *BMC Ecol.* **9**:1-10.
 27. Roussel, Y., M. Wilks, A. Harris, C. Mein, and S. Tabaqchalia. 2005. Evaluation of DNA extraction methods from mouse stomachs for the quantification of *H. pylori* by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* **62**:71-81.
 28. Sagova-Mareckova, M., L. Cermak, J. Novotna, K. Plhachova, J. Forstova, and J. Kopecky. 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2902-2907.
 29. van Elsas, J. D., V. Mäntynen, and A. C. Wolters. 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biol. Fertility Soils* **24**:188-195.
 30. van Soolingen, D., P. W. M. Hermans, P. E. W. de Haas, D. R. Soll, and J. D. A. van Embden. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2578-2586.
 31. Vanitha, J. D., R. Venkatasubramani, K. Dharmalingam, and C. N. Paramasivan. 2003. Large-Restriction-Fragment Polymorphism analysis of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium terrae* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4337-4341.
 32. Wallace, R. J., B. A. Brown-Elliott, S. C. Ward, C. J. Crist, L. B. Mann, and R. W. Wilson. 2001. Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:764-767.
 33. Wallace, R. J., A. Meier, B. A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G. O. Onyi, and E. C. Böttger. 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1676-1681.
 34. Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* **36**:808-812.

III / Conclusion

La comparaison des méthodes de bactériologie (chapitre II §II.1 / article ①) nous a permis de sélectionner celle étant la moins létale pour les NTM, tout en présentant une efficacité comparable aux autres méthodes concernant la diminution de la densité des microorganismes interférents. Cette méthode a permis d'isoler de l'eau de la Seine différentes espèces de NTM et semble intéressante dans un but d'isolement et d'identification d'espèces communes à croissance rapide, en particulier l'espèce *M. chelonae*. Elle pourrait, par exemple, servir pour des études physiologiques et écologiques de NTM à croissance rapide qui semblent facilement isolées de nos échantillons d'eau de Seine. Néanmoins, cette méthode bactériologique n'a pas permis de quantifier ces NTM à croissance rapide, ni d'isoler des NTM à croissance lente en raison de la présence de microorganismes interférents présentant une croissance plus rapide. Ainsi, le développement d'une méthode de biologie moléculaire nous a paru plus judicieux pour évaluer les sources de NTM dans les bassins versants, en particulier dans les environnements aquatiques. Le développement d'une nouvelle technique de PCR temps réel (chapitre II §II.2 / article ②) et l'optimisation des techniques d'extraction de l'ADN mycobactérien (chapitre II §II.3 / article ③) nous offre désormais les outils nécessaires pour atteindre cet objectif.

Cependant, il est à noter que les densités de NTM mesurées seront sous-estimées dans le chapitre III, car au maximum 33 % de l'ADN mycobactérien de l'échantillon est détectable en utilisant la méthode d'extraction d'ADN sélectionnée, combinée à la méthode de PCR en temps réel développée (chapitre II §II.2 / article ② et chapitre II §II.3 / article ③). Dans un objectif d'efficacité de quantification dans une matrice environnementale, l'étape d'extraction de l'ADN mycobactérien s'est avérée plus limitante que l'étape de quantification de l'ADN extrait par PCR en temps réel. Par ailleurs, la méthode développée de quantification en temps réel est plus spécifique que celles utilisées jusqu'alors et permet des quantifications à partir de 125 copies de génome dans l'ADN extrait, soit 250 copies de génomes suivant le protocole utilisé pour les études qui seront présentées dans le chapitre III. Toutefois, cette méthode ne peut pas détecter certaines espèces de NTM comme *M. arupense*, *M. gadium*, *M. lentiflavum*, *M. nonchromogenicum*, *M. psychrotolerans*, *M. szulgai* et *M. tusciae*. Des améliorations, tant sur le plan de l'extraction que sur la sensibilité de la méthode PCR, restent à entreprendre. Néanmoins, la méthode de quantification moléculaire proposée est pour l'instant le seul outil à disposition, d'autant que sa spécificité de 100 % est cruciale pour des échantillons de l'environnement riches en AFB. Il est à noter que la méthode d'extraction d'ADN utilisée pour étudier les sources des NTM dans l'environnement n'a été retenue que sur la base de comparaisons (chapitre II §II.3 / article ③) effectuées sur des échantillons d'eau de surface artificiellement contaminés. Ainsi l'estimation de la justesse des résultats de quantification des NTM dans les sols devrait s'accompagner d'une estimation de l'efficacité de la méthode d'extraction employée. Par ailleurs, il serait intéressant d'explorer d'autres voies d'amélioration de la limite de quantification des NTM dans les échantillons de l'environnement. Par exemple l'utilisation des antibiotiques PANTA (chapitre II §II.1 / article ①) dans des milieux de culture liquides permettrait de sélectionner partiellement les NTM et la confirmation de leur présence dans ces cultures par PCR en temps réel (chapitre II §II.2 / article ② et chapitre II §II.3 / article ③) permettrait de mettre en place une méthode d'estimation de leur quantité sur la base du nombre le plus probable (MPN: most probable number).

« Plus nous avançons dans la connaissance et la maîtrise des technologies de la vie, plus nous nous condamnons à être responsables »

Olivier Arnaud

CHAPITRE III : SOURCES ENVIRONNEMENTALES ET COMPORTEMENTS DES MYCOBACTÉRIES

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

I/ Introduction

Aucunes des méthodes de culture des NTM que nous avons comparées n'a permis de les quantifier dans l'eau de surface en raison de la croissance de microorganismes interférents (chapitre II §II.1 /). Nous avons donc utilisé la méthode de quantification très spécifique de PCR en temps réel que nous avons développée (chapitre II §II.2 /), ainsi que la méthode d'extraction d'ADN la plus efficace (chapitre II §II.3 /), afin de rechercher les sources ponctuelles et diffuses de NTM dans les bassins versants. L'état de l'art sur les sources environnementales de NTM (chapitre I §III /), nous a indiqué que les densités de NTM dans les WWTP n'ont que très peu été étudiées en raison de l'absence d'outils de quantification (chapitre I §III.1 /), les eaux usées et rejets de WWTP ont été sélectionnées comme source ponctuelle potentielle en temps sec. Pour la même raison méthodologique, les densités de NTM dans les sols (chapitre I §I.3.a /) et dans les eaux de surface pendant des événements pluvieux (chapitre I §III.2 /) ont été très peu étudiés, nous avons donc exploré ces sources diffuses potentielles, en échantillonnant des sols urbains, péri-urbains et ruraux et en explorant l'impact de plusieurs affluents sur la qualité de la Marne en temps sec et lors d'un événement pluvieux. Ainsi, le présent chapitre est structuré sous la forme de trois articles. L'article sur les densités de NTM dans les eaux usées est sous presse dans le journal *Environmental Science and Technology*, et les deux n'ont pas encore été soumis.

Article ④ Radomski N., L. Betelli, R. Moilleron, S. Haenn, L. Moulin, E. Cambau, V. Rocher, A. Gonçalves et F.S. Lucas (2010). *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant during dry weather, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and *Enterococcus*. (soumis à *Environmental Science and Technology*).

Dans ce papier concernant une source ponctuelle potentielle, la densité de NTM a été mesurée en amont et en aval des étapes de traitement par décantation physico-chimique et filtration biologique de la WWTP Seine Centre à Colombes en temps sec, dans l'objectif de définir le comportement des NTM en regard d'indicateurs microbiologiques de contamination fécale tels que *E. coli* et les entérocoques intestinaux, et d'indicateurs physico-chimiques classiquement suivis (chapitre III §II.1 / article ④).

Article ⑤ Radomski, N., E. Cambau, F.S. Lucas, S. Haenn, R. Moilleron, A. Pruden, J.O. Falkinham III et L. Moulin (2010). Factors affecting the mycobacteria densities in soils.

Les études des NTM dans les sols ayant toujours porté sur des sols particuliers, nous proposons dans ce papier d'étudier leur densité dans une large gamme de sols et de caractériser ces derniers, en particulier leur concentration en métaux qui reste peu associée aux mycobactéries dans la littérature, en vue de déterminer les facteurs conditionnant la densité des NTM dans les sols (chapitre III §II.2 / article ⑤).

Article ⑥ Radomski, N., E. Cambau, S. Haenn, L. Moulin, R. Moilleron et F.S. Lucas (2010). Mycobacteria density decreases in surface water of urban, peri-urban and rural areas during storm weather.

Tout comme observé pour les sols, la littérature décrit la présence de NTM dans l'eau de différentes origines sans comparer ces dernières entre elles. De plus certaines données nous indiquent que la présence de NTM dans les eaux de surface est significativement plus élevée à la suite d'événements pluvieux consécutifs. Dans l'objectif d'étudier indirectement l'impact de l'eau de ruissellement, nous proposons dans cet article de mesurer au cours d'un événement pluvieux et en temps sec la densité de NTM dans l'eau de surface de la Marne et de ces affluents majeurs qui traversent des zones péri-urbaines ou rurales (chapitre III §II.3 / article ⑥).

II / Travaux entrepris

II.1 / Le comportement de *Mycobacterium* dans une station d'épuration par temps sec : un modèle bactérien distinct de *Escherichia coli* et entérocoques intestinaux (sous presse depuis avril 2011 dans *Environmental Science and Technology*)

Mycobacterium behavior in wastewater treatment plant during dry weather, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and *Enterococcus*

Nicolas Radomski^{1*}, Laetitia Betelli¹, Régis Moilleron¹, Sophie Haenn², Laurent Moulin²,
Emmanuelle Cambau³, Vincent Rocher⁴, Alexandre Gonçalves⁴,
Françoise S. Lucas¹

Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Mame, France¹; Eau de Paris, Direction Recherche et Développement Qualité de l'Eau (DRDQE), 33 avenue Jean Jaurès, FR 94200 Ivry sur Seine, France²; AP-HP, Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, Hôpital Saint Louis, FR 75475 Paris, France³; Direction du Développement et de la Prospective, Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP), 82 avenue Kléber, FR 92700 Colombes, France⁴

Mycobacteria are waterborne emerging pathogens causing infections in human. *Mycobacteria* have been previously isolated from wastewater and sludge, but they were not quantified using culture methods. In order to evaluate the impact of wastewater treatment processes (decantation and biofiltration) on *mycobacteria* removal, we used a real time PCR method specific for *Mycobacterium* quantification. With the aim to identify parameters that could serve as indicator of *mycobacterial* behaviour, *mycobacterial* densities were measured in parallel to those of *Escherichia coli* and *Enterococcus*, and to concentrations of common chemical parameters usually monitored in wastewater. *Mycobacterium* reached $5.52 \times 10^5 \pm 3.97 \times 10^5$ copies/L in the influent, but was not present in the effluent after decantation and biofiltration. Most *mycobacteria* ($98.6 \pm 2.7\%$, i.e. $2.45 \pm 0.78 \log_{10}$) were removed by the physical-chemical decantation, and the remaining *mycobacteria* were removed by biofiltration. Contrary to *Mycobacterium*, *Enterococcus* and *E. coli* were lightly removed by decantation step ($64.3 \pm 15.1\%$, i.e. $0.52 \pm 0.22 \log_{10}$ and $49.5 \pm 8.8\%$, i.e. $0.20 \pm 0.30 \log_{10}$, respectively), and mainly removed by biofiltration ($92.7 \pm 0.4\%$, i.e. $2.81 \pm 0.56 \log_{10}$ and $99.8 \pm 0.1\%$, i.e. $2.88 \pm 0.23 \log_{10}$, respectively). Moreover *Mycobacterium* removal was linked to insoluble compound behaviors, whereas removals of *Enterococcus* and *E. coli* were similar to soluble compound behaviors. These results showed that *Mycobacterium*, *E. coli* and *Enterococcus* follow significantly different behaviors as hydrophobic, hydrophilic and intermediate models, respectively.

Key words: *Mycobacteria*; *Escherichia coli*; *Enterococcus*; Wastewater treatment plant

Due to the human population growth and the increase of activities in industrial and agricultural areas, the demand on water supply has increased over the last century (12, 30). Moreover, this increase of water demand generates higher wastewater volumes, which have an impact on surface water quality and aquatic ecosystems when discharged in surface water with insufficient treatment (18, 30). Because human population expects to use resource water with a high quality (12), the ultimate goal of wastewater management is the protection of the environment according to public health and socio-economic concerns (31). According to European directives which established objectives on preservation and restoration of surface water and ground water by the year 2015 (2000/60/CE), as well as evaluation and control of wastewater effluents (91/271/CE and 98/15/CE), quality of wastewater discharges must be controlled. European regulation is currently focusing on physico-chemical discharges and until now there are no microbiological standards in order to evaluate and control wastewater quality. Except for water reuse, this situation of the regulation is partly the cause and/or the consequence of the lack of adapted microbiological tools for monitoring wastewater microbial quality.

Nowadays, combinations of physical processes (screening, sedimentation, granular-medium filtration, UV disinfection, membrane filtration), chemical processes (coagulation, flocculation, precipitation), and biological processes (activated sludge or aerated lagoon, trickling filters) are commonly used in wastewater treatment plants (WWTP) in order to decrease carbon, nitrogen, phosphorus and turbidity levels (31). Although all combinations of these treatment steps are possible, lamellar decanters are commonly used in west Europe compare to the USA, especially in France where they are used to enhance primary treatment (27).

*Correspondence: Nicolas Radomski, Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Mame, France ; email: nicolas.radomski@leesu.enpc.fr ; tel: +33(0)666665536 ; fax: +33(0)145171627

Besides, wastewater treatment efficiency is commonly controlled by estimating removal rates of organic matter, suspended solids, nutrients (phosphorus and nitrogen) and faecal indicators as *Escherichia coli* and *Enterococcus* (6). The pathogenic microorganisms are rarely studied (11), however faecal indicators are often poorly related with pathogens (35). Without speaking of these common faecal indicators, other indicators and pathogens were studied focusing on WWTP effluents, such as viruses like adenoviruses, enteroviruses, and hepatitis A viruses (21) or coliphage (13), parasites like *Cryptosporidium* or *Giardia* (19), and bacteria like *Aeromonas* (3), *Campylobacter* (5), *Clostridium*, or *Salmonella* (35). Nontuberculous *mycobacteria* (NTM) have never been quantified in wastewaters so far, although they are emerging waterborne pathogens causing human infections, especially pulmonary, skin, and soft tissue infections (8). Only two studies showed that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, or *M. fortuitum* and *M. ratisbonense* can be isolated from influents (36) or in activated sludge (4). Nevertheless, until now the lack of quantitative methods did not allow to estimate removal action of WWTP toward NTM.

The aim of the present study was to quantify NTM removal from wastewater by a primary (physico-chemical decantation using a lamellar settler) and a secondary (biofiltration) treatment. Since NTM are highly hydrophobic, processes designed to remove suspended materials such as decantation should be highly efficient in removing NTM. The physical filtration by the biofiltration step should further help removing remaining NTM. In order to test these hypotheses, we quantified *Mycobacterium* spp. by real-time PCR (25). Common faecal indicators (*E. coli* and *Enterococcus*), total cell counts and several chemical parameters were also quantified in order to identify if NTM behaviour could be modelled by usually monitored parameters. In brief, in order to understand *mycobacteria* behavior in wastewater treatment plant, we compared their density before and after each treatment steps to those of usually monitored microbiological and chemical parameters.

RADOMSKI ET AL.

MATERIALS and METHODS

Wastewater treatment plant description. We studied one of the five WWTP in Paris which are managed by the Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP, <http://www.siaap.fr/>). The WWTP of Seine Centre (Colombes, France) was chosen as model, because it uses physico-chemically aided lamellar decanters, which is representative of the most used primary treatment in France (27). This WWTP, which represents about 800 000 inhabitants equivalent, receives about 2.8 m³/s of wastewater during dry weather and three times this rate of flow during rainy weather (29). As recently described in details (10), the treatment process of this WWTP comprises: screening, grit removal, primary sedimentation using coagulant and flocculant, followed by biofiltration units (Fig. 1). Briefly, pretreatment step includes screening and grit/oil removal of raw sewage, physico-chemical decantation is performed by lamellar settling with the addition of a coagulant (ferric chloride) and flocculant (anionic polymer), and biological treatment corresponds to three steps including aerated biofilters in order to remove carbonaceous pollution, aerated biofilters for nitrification, and anoxic biofilters with the addition of methanol for denitrification. After these three consecutive steps, effluents are discharged into the Seine River.

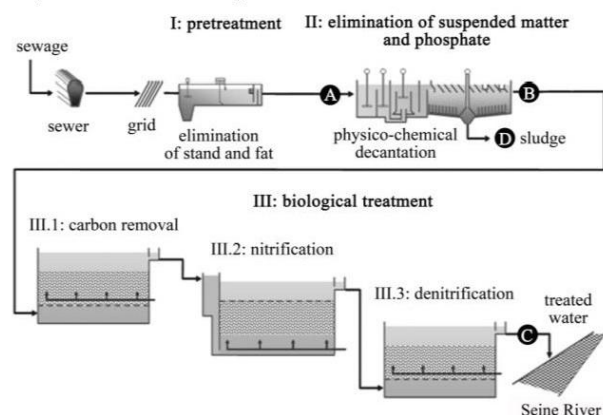


FIG. 1. Sampling of pretreated water (black circle A), water treated by physico-chemical decantation (black circle B), water treated by biofiltration (black circle C), and sludge from physico-chemical decantation (black circle D) in the wastewater treatment plant (WWTP) in Colombes (France).

Sampling points and sample preparation. In order to study the removal of NTM by each step of the treatment, water samples were collected after the pretreatment step (sampling point A), after the physico-chemical decantation step (sampling point B), and after the biofiltration step (sampling point C) during dry weather conditions (Fig. 1). In addition, sludge coming from the physico-chemical decantation was sampled in order to quantify *Mycobacterium* (sampling point D) (Fig. 1). Between April 2008 and April 2009, thirteen 24-h composite water samples were collected in a sterile glass bottle at each sampling site using automatic refrigerated samplers (at 4°C), and transported to the laboratory within 6 h. Concerning total cell enumeration, sampled water was fixed with 2.5% of paraformaldehyde (Fisher Scientific) buffered at 5% with boric acid (Sigma Aldrich), and conserved at 4°C before processing. Water samples used for enumeration of *E. coli* and *Enterococcus* were processed immediately upon arrival at the laboratory. Concerning NTM enumeration, one liter of water was concentrated by a first centrifugation (7,000×g, 15 min), following by a second centrifugation applied to the pellet (3,500×g, 15 min). These concentrated water samples, as well as the sludge samples, were conserved at -20°C before processing. Concerning usual chemical parameters, all analyses were conducted on 24-h composite samples at similar points in the WWTP.

Mycobacteria behavior in wastewater treatment plant

Microbiological analyses. Direct counts of total cells were estimated after ten-fold dilution in phosphate buffer (120 mM, pH 7.2) of fixed samples, and 1 ml of diluted samples was used for the staining procedure. Cells were stained with 4'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) reagent (Boehringer Mannheim GmbH) as previously described (15, 23), stained samples were filtrated at 0.22 μm (GE Water), and filters were observed with an epifluorescence microscope (Olympus BH-2-RFCA) using an immersion oil for fluorescent microscopy (Olympus UVFL SI). Enumeration of *E. coli* and *Enterococcus* was performed by most probable number (MPN) evaluation in microplates following recommendations of European standards used for control of quality of recreational waters (NF EN ISO 9308-3 and NF EN ISO 7899-1, respectively). MPN was estimated using the software Most Probable Number Calculator, version 4.04 (16).

NTM density was estimated by real time PCR. Mycobacterial DNA was extracted using previously described procedure (34), and four phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, v/v) purification steps were conducted. The aqueous phase was then recovered using Phase Lock Gels™ (5 Prime), and DNA was precipitated with isopropanol, and wash with cold ethanol at 70%. After ethanol evaporation at 37°C, DNA was dissolved in TE buffer (10 mM Tris pH 7.6; 1 mM EDTA), and 5-fold dilutions were performed in TE buffer. According to the procedure described in Radomski et al. (25), mycobacterial genome copies were estimated by real-time quantification PCR using *M. chelonae* ATCC 35752^T strain DNA as standard, 110F forward primer, I571R reverse primer, H19R probe labelled with the fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein on 5' end and Black Hole Quencher on the 3' end (Eurogentec), qPCR MasterMix plus low 6-carboxy-X-rhodamine (Eurogentec), and ABI 7500 real-time PCR system with SDS software (Applied Biosystems).

Chemical analyses. The certified laboratory (European cooperation for Accreditation) of the Seine Centre WWTP measured total suspended solids (TSS), total and soluble chemical oxygen demand (COD_t and COD_s), biochemical oxygen demand (BOD), total Kjeldahl Nitrogen (TKN), orthophosphates (PO₄), and carbonate ions (CA).

Statistical analyses. Statistical analyses of data were carried out using a generalized linear model (GLM) with the Statgraphics Plus 5.1 software (Manugistics), and principal component analysis (PCA) with the JMP 7 software (Software And Services). The functioning of the WWTP of Seine Centre during our study can be considered as normal, because major chemical parameters allowing monitoring of a WWTP (i.e. TSS, PO₄ and CA), were not significantly different ($p=0.7076$, $p=0.1478$ and $p=0.2471$, respectively) from the same parameters measured daily between 2006 and 2009 during dry weather ($n=2116$, $df=1$).

RESULTS and DISCUSSION

Our goal was to evaluate the effects of WWTP treatment steps toward mycobacteria removal, and to figure out if any usual parameter could predict NTM removal. We hypothesized that due to their hydrophobic characteristic, NTM should be at least removed at the same level as TSS by the decantation process. Biofilters should further remove NTM by physical filtration or by adsorption on the biofilm. To our knowledge, this is the first time that mycobacterial density is estimated in wastewater. Until now, detection of mycobacteria in wastewater or sludge was only performed using bacteriological tools, which do not allow to enumerate mycobacteria in samples with high density of interfering microorganisms (24).

The real-time qPCR method we used was recently developed showing a high level of specificity (25). This technique allowed us to estimate high levels of *Mycobacterium* in pretreated water ($5.52 \times 10^5 \pm 3.97 \times 10^5$ copies/L in 11 positive samples among 13), in water treated by physico-chemical decantation ($0.74 \times 10^4 \pm 1.40 \times 10^4$ copies/L in 7 positive samples among 13), and in sludge ($1.04 \times 10^6 \pm 1.75 \times 10^6$ copies/g in 3 positive samples among 6), while *Mycobacterium* was not detected in the 13 tested samples of

RADOMSKI ET AL.

Mycobacteria behavior in wastewater treatment plant

water treated by biological filtration (Fig. 1 and Fig. 2). These mycobacteria densities should be considered as an underestimation because of DNA loss during extraction procedure, and of real-time qPCR amplification efficacy. According to Käser et al. (14), mycobacterial DNA extraction used in our study is the most efficient method allowing to remove PCR inhibitors, while extracting highest quantity of DNA. We estimated that at the most 33% of mycobacterial cells are detectable using the DNA extraction and the real-time qPCR procedure described above (data not shown). In the other hand, without speaking of the 16S rRNA copy number per mycobacterial genome which vary between one and two among mycobacteria species (26), genome enumeration does not rely with the mycobacterial cell, because genome number in one cell is higher than one during cellular division. As a consequence our results should be considered as underestimated.

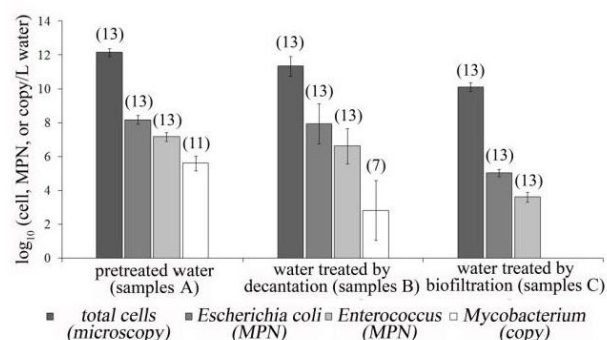


FIG. 2. Concentration of total cells, *Escherichia coli*, *Enterococcus* and *Mycobacterium* in pretreated water, water treated by physico-chemical decantation and water treated by biofiltration in wastewater treatment plant (WWTP) in Colombes (France). Standard deviation error bars are associated to the mean concentrations of cells, most probable numbers (MPN) and genome copies. Number of results under the limit of quantification is put in brackets (n=13).

The treatment processes significantly affected NTM densities (GLM, F=16.14, df=2, n=39, p=0.0001). Mycobacteria were mainly removed by physico-chemical decantation (98.6±2.7%, i.e. 2.45±0.78 log₁₀) accumulating in the sludge with eliminated suspended material, and the few remaining ones were removed by biological degradation (Table 1). These results are in accordance with our hypothesis, since TSS is removed at 86.9±2.7% by the physico-chemical decantation (i.e. 0.89±0.09 log₁₀) and 83.3±9.5% by the biofiltration process (i.e. 0.80±0.20 log₁₀). Mycobacteria are known indeed to be hydrophobic, because of the fatty acid composition of their cell walls (1), which favor their attachment to interfaces (water/solid surface or water/air) and hydrophobic compounds uptake (such as oil, polycyclic aromatic hydrocarbons) (26).

TABLE 1. Reduction of microorganism densities (total cells, *Escherichia coli*, *Enterococcus* and *Mycobacterium*), expressed in decimal logarithm and in percentage (n=13), by decantation and/or biofiltration of wastewater treatment plant (WWTP) in Colombes (France). Standard deviations are associated to the mean concentrations of the positive samples. A stands for pretreated water, B stands for water treated by physico-chemical decantation and C stands water treated by biofiltration

Microorganism	No. of usable days ^a	Mean reduction ± SD					
		physico-chemical decantation (between samples A and B)		biological degradation (between samples B and C)		both treatment (between samples A and C)	
		(Log ₁₀)	(%)	(Log ₁₀)	(%)	(Log ₁₀)	(%)
Total cells	13	0.81±0.32	81.1±11.2	1.22±0.32	92.6±4.5	2.04±0.32	98.9±0.7
<i>Escherichia coli</i>	12	0.20±0.30	49.5±8.8	2.88±0.23	99.8±0.1	3.18±0.23	99.9±0.1
<i>Enterococcus</i>	13	0.52±0.22	64.3±15.1	2.81±0.56	92.7±0.4	3.33±0.57	92.8±0.2
<i>Mycobacterium</i>	7	2.45±0.78	98.6±2.7	3.21±0.86	100±0.0	5.66±0.28	100±0.0

^a No. of usable days corresponds to the number of sampling day taken into account in order to calculate a mean reduction. Concerning *E. coli*, one sampling day was not taken into account due to a concentration in sampling site B higher than in sampling site A. Concerning *Mycobacterium*, six sampling day was not taken into account due to results below the limit of quantification in sampling sites B. Limits of quantification correspond to 0.0 log₁₀ total cells/L, 0.5 log₁₀ MPN/L for *E. coli* and enterococci, and about 3 log₁₀ copies/L for mycobacteria.

It must be noticed that physico-chemical decantation removal of *Mycobacterium* is higher than that for TSS (98.6±2.7% versus 83.3±9.5%). It means that during physico-chemical decantation, TSS removal is not the only process explaining *Mycobacterium* removal. The small portion of mycobacteria which was not removed with settleable (>100 μm) and supracolloidale (1.2-100 μm) matters, corresponding to the TSS measure (33), could be clung to the lamellar decanter side, and/or removed with colloidal matters measuring less than 1.2 μm (33), especially with colloidal organic matter which is mainly composed of humic substances and extracellular polymeric substances (37). The elimination process in biofilters is more complex, as both physical and biological processes occur. Biofilters achieve the removal of particles by physical filtration, and adsorption of cells on the biofilm can also occur. Moreover, interspecific interaction such as predation by protozoa and metazoan, as well as phage lysis may also occur in biofilters (7).

Our results showed that densities of total cells, *E. coli* and *Enterococcus* were significantly higher in pretreated water than mycobacterial density (Fig. 2, Table 2). Densities of total cells estimated at 1.59±0.74×10¹² cells/L, *E. coli* represented 1.75±1.12×10⁸ MPN/L, and *Enterococcus* densities reached 1.75±1.15×10⁷ MPN/L. Like for mycobacteria, the densities of these different microbial groups were also significantly reduced by the two treatment stages (GLM, total cells: F=50.06, df=2, n=39, p=0.0001, *E. coli*: F=19.32, df=2, n 39, p=0.0001, *Enterococcus*: F=20.47, df=2, n 39, p=0.0001). Physico-chemical decantation eliminated 49.5±8.8% of *E. coli* (i.e. 0.20±0.30 log₁₀), while 99.8±0.1% (i.e. 2.88±0.23 log₁₀) were removed by biological degradation (Table 1). The same behavior was observed for *Enterococcus*, but with more influence of the physico-chemical decantation (64.3±15.1%, i.e. 0.52±0.22 log₁₀ reduction) (Table 1). For these two indicators, biofiltration presents the same efficiency (Table 1). A study of the attachment preference of *E. coli* to soil particles showed that only 35% of these faecally derived bacteria were associated with soil particles larger than 2 μm (20). This observation is in accordance with our results showing that reduction of *E. coli* density by physico-chemical decantation is less efficient compared to the other studied microorganisms (Table 1). Others studies showed a 2 log reduction of *E. coli* during water treatment in the WWTP of Seine Centre (Colombes, France) (19, 28). As *Mycobacterium*, *Enterococcus* are able to form biofilm (17, 32) or aggregates in stream (22), but seems to be less attached than NTM. Without speaking of total cells which do not represent a specific bacterial cluster, *Mycobacterium*, *E. coli*, and *Enterococcus* represent three different models with specific behaviors in the decantation process. GLM analysis showed that the effect of the treatment processes on microorganism densities significantly differed according to the bacterial type whatever the sampling date (Table 2). *Mycobacterium* was primarily removed by physico-chemical decantation, and *E. coli* and *Enterococcus* were less removed by physico-chemical decantation and mostly by biological filtration.

RADOMSKI ET AL.

TABLE 2. Factors explaining significantly the variation of total cells, *Escherichia coli*, *Enterococcus* and *Mycobacterium* in pretreated water, water treated by physico-chemical decantation and water treated by biofiltration of wastewater treatment plant (WWTP) at Colombes (France). Generalized linear model analysis, n=39 for each microorganism. Sampling date ($p=0.4457$) was rejected from the final model. All removed interactions were not significant

Explicative factors	d.f.	F ratio	p
Microorganism type	3	78.14	≤ 0.00001
Sampling area	2	50.07	≤ 0.00001
Microorganism x Sampling area	6	50.06	≤ 0.00001
Final model	11	57.72	≤ 0.00001

d.f.: degree of freedom, F: Fisher's F statistic, p: probability value

As mycobacteria are highly attached to particles and mainly removed by the decantation process, we could expect that parameters which are also primarily removed by physico-chemical decantation should constitute firmly predictive variables for *Mycobacterium* behavior. Firstly, two-dimensional representation of the scores resulting of PCA, showed also that samples A, B and C have specific profiles (Fig. 3a), and consolidated our findings about studied microorganisms having different behaviors in WWTP (Table 2). More precisely, *Mycobacterium*, PO4, TSS, CODt and BOD were clustered together by two-dimensional representation of the PCA factors; contrary to *E. coli*, *Enterococcus*, CA, CODs and TKN which were merged together (Fig. 3b). Mainly with the first components (83.3%), this PCA analysis is robust showing 98.8% of the data with two components. The cluster including *Mycobacterium*, corresponds to the physico-chemical decantation, because TSS and PO4 are known to be preferentially removed during this treatments step (2). By analogy, the cluster including *E. coli* and *Enterococcus*, corresponds to the biofiltration (Fig. 1), because nitrogenous pollution (i.e. TKN) is removed from the wastewater during this step by nitrification and denitrification (Fig. 3b). This two-dimensional representation of the PCA factors (Fig. 3b), is completely in accordance with the previous description of three bacterial behavior models (Table 1 and Table 2), where mycobacteria are well removed by physico-chemical decantation (MY spot in cluster corresponding to the physico-chemical decantation), and *E. coli* are mainly removed by biological filtration, whereas *Enterococcus* constitutes an intermediate model which is also mainly removed by biological filtration (Fig. 3b). *Mycobacterium* removal is linked to insoluble compound behaviors, whereas removals of *Enterococcus* and *E. coli* are linked to soluble compound behaviors.

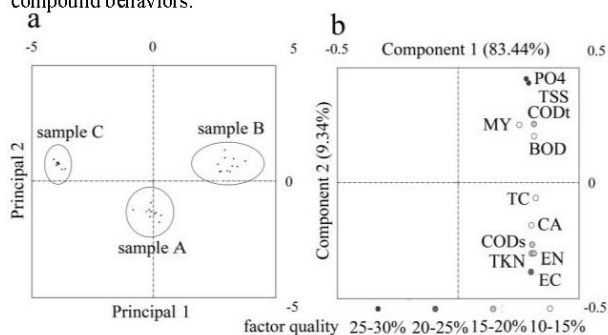


FIG. 3. Two-dimensional representation of the scores for each pair of principal components (a) and of the principal components analysis factors (b) including decimal logarithmic densities of total cells (TC), *Escherichia coli* (EC), *Enterococcus* (EN), *Mycobacterium* (MY), total suspended solids (TSS), total and soluble chemical oxygen demand (CODt and CODs), biochemical oxygen demand (BOD), total Kjeldahl Nitrogen (TKN), orthophosphates (PO4), and carbonates (CA), measured in pretreated water (sample A), in water treated by physico-chemical decantation (sample B) and in water treated by biofiltration (sample C) of wastewater treatment plant (WWTP) in Colombes (France). n=31 for each factor.

Mycobacteria behavior in wastewater treatment plant

In conclusion, the two treatment steps together (decantation followed by biofiltration) removed $5.66 \pm 0.28 \log_{10}$ of *Mycobacterium*, $2.04 \pm 0.32 \log_{10}$ of total cells, $3.18 \pm 0.23 \log_{10}$ of *E. coli*, and $3.33 \pm 0.57 \log_{10}$ of *Enterococcus* (Table 1). *E. coli* and *Enterococcus* densities in the effluent ($1.75 \pm 1.12 \times 10^8$ MPN/L and $1.75 \pm 1.15 \times 10^7$ MPN/L, respectively) were higher than recommendation of European standards for recreational water quality (Directive 2006/7/EC) and higher than in the Seine River upstream WWTP (19), which emphasizes the necessity to evaluate the impact of WWTP discharges, according to WWTP and river flows. Indeed, these two elements should be taken into account in the same time in order to estimate the impact of WWTP on surface water. Even if there is no water quality standards for mycobacterial density in WWTP effluent, mycobacteria discharges must be avoided in order to decrease the occurrence of human mycobacteriosis which can be associated with water exposures (9). Studies on NTM in wastewater effluent should focus on *M. avium* which is the major mycobacterial species responsible of human infections (26). For sludge, the high levels of mycobacteria observed suggest that sludge should be treated before disposal or reuse. In the case of the Seine-Centre WWTP, the sludge from physico-chemical decantation is incinerated which seems to be an appropriate treatment. When WWTP sludge is spread on lands, it seems necessary to treat this waste before land spreading before allowing grazing by livestock or before harvesting food crops (11), in order to avoid animal infections and food crop contamination. More precisely, impact studies of sludge treatment process toward mycobacteria removal, especially digestion process, are in everyone's interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the PIREN-Seine program (<http://www.sisyphes.jussieu.fr/internet/piren/>), by the OPUR program (<http://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>), and by the grant CRECEP-S'TEA from the city of Paris. We are grateful to C. Briand of the SIAAP for providing the samples. We thank also the laboratory technicians of the SIAAP for analyzing ordinary wastewater parameters in the WWTP Seine Centre in Colombes, France.

REFERENCES

- Alsteens, D., C. Verbeke, E. Dague, D. Raze, A. R. Baulard, and Y. F. Dufrene. 2008. Organization of the mycobacterial cell wall: A nanoscale view. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 456:117-125.
- Amuda, O. S., and A. Aladeb. 2006. Coagulation/flocculation process in the treatment of abattoir wastewater. *Desalination* 196:22-31.
- Araujo, R. M., R. M. Arribas, and R. Pares. 1991. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 71.
- Berekaa, M. M., and A. Steinbüchel. 2000. Microbial Degradation of the Multiply Branched Alkane 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane (Squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisonense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4462-4467.
- Bolton, F. J., D. Coates, D. N. Hutchinson, and A. F. Godfre. 1987. A study of thermophilic campylobacters in a river system. *J. Appl. Bacteriol.* 62:167-176.
- Decamp, O., and A. Warren. 2001. Abundance, biomass and viability of bacteria in wastewaters: Impact of treatment in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Water Res.* 35:3496-3501.
- Dempsey, M. J., I. Porto, M. Mustafa, A. K. Rowan, A. Brown, and I. M. Head. 2006. The expanded bed biofilter: combined nitrification, solids destruction, and removal of bacteria. *Water Sci. Technol.* 54:37-46.
- Falkinham, J. O. 1996. Epidemiology of Infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:177-215.
- Falkinham, J. O. 2009. Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology* 107:356-367.
- Gasperi, J., V. Rocher, S. Gilbert, S. Azimi, and G. Chebbo. 2010. Occurrence and removal of priority pollutants by lamella clarification and biofiltration. *Water Res.* 44:3065-3076.
- Godfree, A., and J. Farrell. 2005. Processes for managing pathogens. *Journal of Environmental Quality* 34:105-113.
- Hurst, A. M., M. J. Edwards, M. Chipps, B. Jefferson, and S. A. Parsons. 2004. The impact of rainstorm events on coagulation and clarifier

RADOMSKI ET AL.

- performance in potable water treatment. *Science of The Total Environment* 321:219-230.
13. Jiang, S., R. Noble, and W. Chu. 2001. Human Adenoviruses and Coliphages in Urban Runoff-Impacted Coastal Waters of Southern California. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:179-184.
 14. Käser, M., M. T. Ruf, J. Hauser, L. Marsollier, and G. Pluschke. 2009. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:414-418.
 15. Kepner, R. L., and J. R. Pratt. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and present. *Microbiol. Rev.* 58:603-615.
 16. Klee, A. J. 1996. Most Probable Number Calculator v. 4.04. Cincinnati, OH, USA: Risk Reduction Engineering Laboratory United States Environmental Protection Agency.
 17. Kristich, C. J., Y. H. Li, D. G. Cvitkovitch, and G. M. Dunny. 2004. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 186:154-163.
 18. Menezes, F. M., R. Areal, and D. Luketina. 1996. Removal of particles using coagulation and flocculation in a dynamic separator. *Powder Technol.* 88:27-31.
 19. Moulin, L., F. Richard, S. Stefania, M. Goulet, S. Gosselin, A. Gonçalves, V. Rocher, C. Paffoni, and A. Dumètre. 2010. Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. *Water Res.* 44:5222-5231.
 20. Oliver, D. M., C. D. Clegg, A. L. Heathwaite, and P. M. Haygarth. 2007. Preferential attachment of *Escherichia coli* to different particle size fractions of an agricultural grassland soil. *Water Air Soil Pollution* 185:369-375.
 21. Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre, and R. Girones. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3376-3382.
 22. Plancherel, Y., and J. P. Cowen. 2007. Towards measuring particle-associated fecal indicator bacteria in tropical streams. *Water Res.* 41:1501-1515.
 23. Porter, K. G., and Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25:943-948.
 24. Radomski, N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moilleron, and F. S. Lucas. 2010. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3514-3520.
 25. Radomski, N., F. S. Lucas, R. Moilleron, E. Cambau, S. Haenn, and L. Moulin. 2010. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7348-7351.
 26. Radomski, N., R. Moilleron, F. S. Lucas, and J. O. Falkinham III. 2010. Challenges in environmental monitoring of pathogens: Case study in *Mycobacterium avium*. In A. Méndez-Vilas (ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2. Formatex Research Center, Badajoz.
 27. Reardon, R. D. 2005. Clarification concepts for treating peak wet-weather wastewater flows. *Water Environment Federation* 51:4431-4444.
 28. Rocher, V., C. Paffoni, A. Gonçalves, V. Legaigneur, A. Dutot, and M. Gonsailles. 2006. Le traitement des eaux usées par biofiltration : Cas de la station Seine Centre, Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP). *Techniques Sciences Méthodes* 10:115-125.
 29. Rocher, V. C., A. Paffoni, S. Gonçalves, Legaigneur, M. Gonsailles, and a. A. Dutot. 2006. Le traitement des eaux usées par biofiltration : cas de la station Seine centre (Siaap). *TSM. vol. 1:*p. 105-125.
 30. Servais, P., T. Garcia-Armisen, I. George, and G. Billen. 2007. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling. *Science of The Total Environment* 375:152-167.
 31. Tchobanoglous, G., F. L. Burton, and H. D. Stensel. 2002. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse*, 4 ed. Metcalf & Eddy, McGraw Hill Higher Education.
 32. Toledo-Arana, A., J. Valle, C. Solano, M. J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J. R. Penadés, and I. Lasa. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4538-4545.
 33. Vaillant, S., M. F. Pouet, and O. Thomas. 1999. Methodology for the characterization of heterogeneous fractions in wastewater. *Talanta* 50:729-736.
 34. van Soolingen, D., P. W. M. Hermans, P. E. W. de Haas, D. R. Soll, and J. D. A. van Embden. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2578-2586.
 35. Wéry, N., C. Lhoutellier, F. Ducray, J. P. Delgenès, and J. J. Godon. 2008. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res.* 42:53-62.
 36. Whan, L., H. J. Ball, I. R. Grant, and M. T. Rowe. 2005. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7107-7112.
 37. Worms, I. A. M., Z. A. G. Szigeti, S. Dubascoux, G. Lespes, J. Traber, L. Sigg, and V. I. Slaveykova. 2010. Colloidal organic matter from wastewater treatment plant effluents: Characterization and role in metal distribution. *Water Res.* 44:340-350.

II.2 / Facteurs conditionnant les densités de mycobactéries dans les sols

Factors affecting the mycobacteria densities in soils

Nicolas Radomski^{1*}, Emmanuelle Cambau², Françoise S. Lucas¹, Sophie Haenn⁴,
Régis Moilleron¹, Amy Pruden⁴, Joseph O. Falkinham, III⁵,
and Laurent Moulin⁴

Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France¹; Université Paris Diderot, Hôpital Saint Louis AP-HP, Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, FR 75475 Paris, France²; Eau de Paris, Direction Recherche et Développement Qualité de l'Eau (DRDQE), 33 avenue Jean Jaurès, FR 94200 Ivry sur Seine, France³; Department of Civil and Environmental Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 24061, USA⁴; Department of Biological Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 24061, USA⁵

Soils are one of the natural habitats of the nontuberculous mycobacteria (NTM). Previous studies of NTM in soils have focused on rural or urban soils, but have not directly compared numbers in the different soils to define the preferred soil habitat of NTM. Humic- and fulvic-rich soils have been reported to harbor high numbers and support the growth of NTM. Herein we report the comparison of NTM densities in a variety of rural and urban soils by real-time quantitative PCR. The highest NTM densities were measured in peat forest soils ($9.27 \times 10^4 \pm 5.00 \times 10^4$ copies/g dw) and in lightly urbanized soils near a costal swamp ($1.71 \times 10^9 \pm 2.85 \times 10^6$ copies/g dw), whereas they were not detected in urban woodland, livestock farming field, crop farming field, lightly-urbanized green space or highly urbanized green space soils. A general linear model indicated that high NTM densities were significantly associated ($p < 0.0001$) with low soil pH and high soil moisture, organic matter, and iron content.
Key words: Mycobacteria; soils; real-time qPCR; iron

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are emerging environmental pathogens capable of infecting both humans and animals (19). It is generally accepted that water (7, 8, 21) and soils (3, 6, 24) are potential sources of NTM infection. A review of the literature indicates that NTM can be isolated from rural (3, 10, 13) and urban (30) soils. Prolonged contact with soil such as farmers, especially in a temperate climate, has been identified as a risk factor for *Mycobacterium avium* infection (24). Discovery that peat-rich soils from either Finnish boreal coniferous forests or east coast US swamps had high numbers of NTM (Kirschner et al., 1992), led to studies showing that fulvic and humic acids stimulated the growth of *M. avium* and *M. intracellulare* (19). NTM presence in the environment was shown to be associated with low pH and oxygen levels and high concentrations of Fe, Al, Cu, Co, and Cr (3, 11, 13). Another study focusing on a livestock farming area (beef ranches), showed that NTM isolation from soil was significantly associated with low pH and low calcium, but high Fe, Zn and Mn levels (18). Using *in situ* fluorescent sandwich hybridization (FISH), NTM numbers of up to 1.0×10^7 to 1.0×10^8 copies/g in a rural soil of low pH (17). That study showed that NTM numbers based on FISH values were 10- to 100-fold higher than values by culture (17). Here we use a recently described real-time PCR method for NTM enumeration (22) to compare NTM numbers in a variety of rural and urban soils during dry weather and compare numbers with physico-chemical parameters in soils, especially some metals which appear to be correlated with the presence of NTM in river water (11).

MATERIALS and METHODS

Sampling of soils. All soils were sampled in the first 10 cm, where conditions (i.e. absence of light, heterotrophic and microaerobic conditions) are considered to be favorable for NTM growth (12). Sampling campaigns were carried out during dry weather in order to avoid the influence of soil washing due to seasonal (11) and to facilitate the focus of our study on NTM habitats. In order to achieve this goal, during months with tempered temperatures (15, 29), four soil samples were sampled in a radius of about 500 meters in seven areas with similar latitudes (Table 1).

*Correspondence: Nicolas Radomski, Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France; email: nicolas.radomski@leesu.enpc.fr; tel: +33(0)666665536; fax: +33(0)145171627

TABLE 1. Geographical coordinates of the studied soils sampled. Soils of each sampling area (n=4) were sampled in a radius of about 500 meters

Sampling area	Country or State (Sampling month)	Geographical coordinates	
		Vertical	Horizontal
peat forest	West-Virginia	38°12'03.10"N	80°16'05.33"W
lightly-urbanized woodland	Virginia (July)	37°13'14.90"N	80°24'58.28"W
livestock farming field ^a	Virginia (July)	37°12'41.47"N	80°25'08.09"W
crop farming field	Virginia (July)	37°12'27.12"N	80°25'41.23"W
lightly-urbanized green space	Virginia (July)	37°13'59.44"N	80°25'12.59"W
lightly urbanized near costal swamp	Florida (January)	26°19'23.03"N	81°50'31.93"W
highly urbanized green space	France (August)	48°48'40.76"N	2°24'11.31"E

^abovine livestock.

Enumeration of mycobacteria. Mycobacterial DNA was extracted using previously described procedures (28), and a successive purification step was conducted (v:v) using phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1). The aqueous phase was then recovered using Phase Lock Gels™ (5 Prime), and DNA was precipitated with isopropanol (v/v), and washed with cold ethanol at 70%. Dried DNA pellet was dissolved in TE buffer (10 mM Tris pH 7.6; 1 mM EDTA), and three 10-fold dilutions were performed in TE buffer, in order to avoid PCR inhibitions due to high DNA concentrations. According to the procedure of our previously developed real-time quantitative PCR method (22), mycobacterial genome copies were estimated using *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752^T strain DNA as standard (5-fold dilutions), 110F forward primer (900 nM), I571R reverse primer (300 nM), H19R probe (50 nM) labelled with the fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein on 5'end and Black Hole Quencher on the 3'end (Eurogentec), qPCR MasterMix plus low 6-carboxy-X-rhodamine (Eurogentec), and ABI 7500 real-time PCR system with SDS software (Applied Biosystems). Correlation coefficient of the standard curve was controlled and estimated as previously described at $98.6 \pm 0.2\%$ (22).

Physical and chemical analyses. Hue, value and chroma of soil color was estimated using the Munsell color system (16), and the weight loss after one night at 105°C allowed the measurement of moisture content of the sample (according to international standard ISO 11465:1993). Based on a modified procedure (27), carbon content was estimated measuring particulate organic carbon (POC) after freeze-drying (Christ Alpha 1-2 LD plus, Bioblock Scientific) and acidification of the soil (50 mg of sample dampened with 3% HCl), using the rapid CS cube analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH) and calibration solutions constituted of phthalic acid monopotassium salt (Ref. 17.992-2, Sigma-Aldrich).

RADOMSKI ET AL.

Nontuberculous mycobacteria in soils

In parallel, humid soil was dried at ambient temperature over night, sieved at 2 mm and ground at 200 µm (according to international standard ISO 11464: 2006) in order to homogenize the sample before other physical and chemical analyses. After dilution of the homogenized soil (2 g in 10 ml of water), electrical conductivity and pH were measured (according to international standards ISO 11265: 1994 and ISO 10390: 2004, respectively). Loss on ignition (LOI) of the homogenized sample (about 2 g) at 550°C (European standard EN 12-879) was measured in order to estimate the content of organic matter content (25). Concerning metals (Ag, Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn), samples were digested by a combination of HNO₃ (Sigma-Aldrich) and HCl (Fischer) acids in order to efficiently oxidize the organic matter (26). Briefly, homogenized soil (about 1 g) was acidified with HNO₃ (2 ml at 10%) and dried at 110°C, then heat at 450°C during 3 h and dissolved in HCl (10 ml at 37%). After addition of boiling HNO₃ (5 ml at 65%), acid was evaporated by heating, sample was then dissolved in boiling HCl (20 ml at 2N), filtrated (Ashless grade N°40-1440150, Whatman), and diluted in HCl (final volume of 250 ml at 2N). Metals (Ag: 328 nm, Al: 167 nm, Cd: 214 nm, Cr: 267 nm, Cu: 324 nm, Fe: 238 nm, Mn: 257 nm, Ni: 231 nm, Pb: 220 nm and Zn: 213 nm) were analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) following manufacturer recommendations (Varian Vista Pro CCD simultaneous ICP-OES). More precisely, the ionization process was initiated using argon flow, and the analytical parameters were optimized (radio frequency generator: 1.30 kW, plasma gas flow 15 L/min, nebulizer gas pressure: 200 KPa, sampling period: 35 s, sampling pump speed: 20 rpm, rinsing period: 20 s). Metal quantification was performed using Spex multi-element calibration solution at 0.5% v/v (Horiba), which was previously controlled using a standard solution (ACSD Voisins-le-Bretonneux).

Statistical analyses. Except for moisture content, all the other microbiological and physico-chemical parameters were given per dry weight (dw) of soil. Data analyses were performed based on the average results of the 28 sampled soils which were analyzed three times for each parameter analyzed. Statistical analyses were carried out using a generalized linear model (GLM) in the Statgraphics Plus 5.1 software (Manugistics).

RESULTS

Physico-chemical parameters. The colors of peat forest (dark-maroon around 6R 1/6), urban woodland (dark-orange 5YR 4/9), livestock farming field (light-brown around 8YR 3/6), crop farming field (light-brown around 10YR 1/6), lightly urbanized green space (dark-brown around 3YR 3/8), lightly urbanized soils near coastal swamp (dark-maroon around 8R 1/6) and highly urbanized green space (dark-orange around 5YR 2/6) were in accordance with soil type. Consequently, color was removed from the statistical analyses. As expected the concentrations of Ag never exceeded the limit of quantification (LOQ), and the concentrations of Cd slightly exceeded this limit in only 75% of the samples (Supplementary Table 1). Consequently, these two metals were not taken into account in the statistical analyses. In addition, organic matter (i.e., LOI at 550°C) and carbon content (i.e., POC) were significantly (GLM, $F = 1.49 \times 10^2$, $df = 1$, $n = 39$, $p = 0.0001$) correlated (correlation coefficient of 85.18%). Means of moisture, organic matter, carbon and iron contents reached $29 \pm 17\%$, $32 \pm 23\%$, $18 \pm 18\%$ and $79 \pm 59 \mu\text{g/g}$ (dw), respectively, in peat forest soils and lightly urbanized soils near a coastal swamp, and $16 \pm 3\%$, $9 \pm 5\%$, $4 \pm 3\%$ and $53 \pm 22 \mu\text{g/g}$ (dw), respectively, in the other studied soils (Supplementary table 1).

NTM density in soils. Taking into account all sampled soils, NTM were detected and measured in 14 of 72 (19%) of the samples (i.e., 14 positive assays among 24 samples analysed in triplicate). NTM density was estimated at $9.3 \times 10^4 \pm 5.0 \times 10^4$ copies/g in peat forest soils (i.e., 7 positive samples among 12 assays) and at $1.8 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^6$ copies/g in a lightly urbanized soil of neutral pH (7.4) near a coastal swamp (i.e. 7 positive samples among 12 assays). NTM were not detected (i.e. below the limit of quantification estimated at

about 3 log₁₀ copies/L) in the other soils collected (Table 1 and Supplementary Table 1). GLM analysis showed that NTM density was associated with sampling site and high moisture, organic matter, and carbon iron content (Table 2).

TABLE 2. Factors explaining variation of mean soil mycobacteria densities (GLM analysis, n=24 in triplicate assays). All other factors and all interactions were not significant ($p > 0.05$)

Explicative factors	d.f.	F ratio	p
Sampling area	6	14.56	≤0.0001
Iron content	1	17.28	≤0.001
Moisture content	1	42.03	≤0.0001
Loss of ignition at 550°C	1	38.88	≤0.0001
Particular organic matter content	1	25.04	≤0.0001
Final model	16	10.12	≤0.00001

d.f.: degree of freedom.

Indeed, moisture, organic matter, carbon and iron contents were significantly (Table 2) higher in peat forest soils and lightly urbanized soils near a coastal swamp than in the other soils analyzed (Fig. 1).

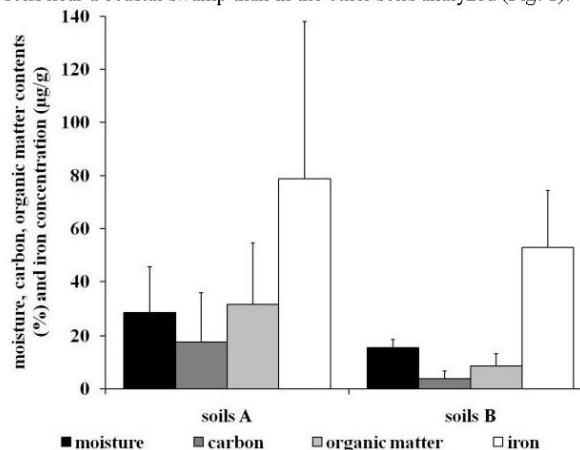


FIG. 1. Factors explaining significantly mycobacteria densities measured greater than the limit of quantification (n=24 in triplicate assays) in soils from peat forest and lightly urbanized area near coastal swamp (soils A), in comparison with soils from urban woodland, livestock farming field, crop farming field, lightly-urbanized green space and highly urbanized green space, where mycobacteria were not detected (soils B). All results are given in dry weight.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first time that mycobacteria density is estimated in a wide range of soils and considered along with the analysis of several key soil characteristics. In previous studies, the soil types from urban and rural areas were independently assessed in livestock farming areas (18) or in sub-urbanized areas (23). Moreover, it is also the first study using real-time qPCR (22) to compare mycobacterial density in rural and urban areas.

Occurrence and density of NTM in soils. On the whole, NTM were detected in 19% of the soil samples. In contrast, previous studies estimated NTM occurrence in soils at 18% (350 tested samples) in sub-urbanized areas (23) and 16% (61 tested samples) in livestock farming areas (18), whereas mycobacteria was not detected in these types of soils in our studies. This may indicate that livestock farming and sub-urbanized areas are not the most favorable soils for NTM growth, considering that the present study integrates a larger range of soils compared to the two previous studies (18, 23). Our estimate of NTM density in the low pH peat forest soils (i.e. $9.3 \times 10^4 \pm 5.0 \times 10^4$ copies/g) were lower than those of Nieminen *et al.*, who estimated NTM density between 1.0×10^7 and 1.0×10^8 copies/g of rural soils of low pH using FISH (17). Therefore, NTM numbers from this study are more in agreement with culture results (10, 13) than those obtained by FISH (17). Nevertheless, specificity of our method was controlled

in vitro using several nontarget microorganisms (22), whereas specificity of primers and probes designed by Nieminen *et al.* was only controlled *in silico* (17). Studies comparing NTM numbers in soils estimated by culture and culture-independent means are needed.

Do NTM prefer an acidic environment? While several studies have shown that NTM numbers are high in acidic habitats (3, 11, 13, 14, 17, 18), our results showed that high NTM were encountered in neutral soils like the lightly urbanized soils near a coastal swamp (pH 7.4). NTM can grow over a wide range of pH, from 5-8 (5, 9, 20). The presence of NTM in acidic soils is consistent with the fact that one NTM species, *Mycobacterium avium* has been shown to survive exposure to stomach acid (pH 2.2) (2). It is also possible that acidity may be serving as a surrogate for another factor, such as the availability of metals, particularly iron.

NTM and iron content of soils. In the wide range of soils studied, NTM numbers were correlated with iron content. In soils where livestock are raised, high iron content was associated with high NTM numbers (18). Iron acquisition is a problem for NTM because of their hydrophobic, impermeable surface; thus they are dependent upon the production of surface and extracellular iron-binding compounds. In the environment, exochelins represent the single most important means of iron acquisition (1). Growth of the soil saprophyte *Mycobacterium neoaurum* under iron-deficient culture conditions is dependent upon the production of iron-binding exochelins (4). Further, it is quite possible that the higher numbers of NTM in acidic soils represents the greater availability of soluble iron. No association was observed between NTM numbers and either Zn or Mn concentrations in agreement with previous results (18).

NTM association with high organic matter content. The fact that high carbon and organic matter content were positively associated with NTM densities is consistent with reports of the correlation between *M. avium* and *M. intracellulare* numbers and assimilable organic carbon and biodegradable organic carbon levels in water distribution systems (8). However, NTM numbers (i.e. 1.7×10^6 copies/g) were also high in the lightly urbanized soil near a coastal swamp of low organic matter content (Supplementary Table 1). These results may mean that NTM are more ubiquitous than previously thought, and that as detection methods improve and interest in NTM increases, we may broaden our knowledge on this bacterial group and revise previous statements on NTM ecology. However, these results may also mean that this lightly urbanized area could be impacted by the proximity of the acidic swamp, especially during storm weather when runoff water suspends soil matter.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the PIREN-Seine program (<http://www.sisypho.upmc.fr/piren/>), by the OPUR program (<http://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>), by grant from STEA (Service Technique de l'Eau et de l'Assainissement) of City of Paris, and by international mobility fellowship from Paris-Est University. We are grateful to Catherine Lorgeoux and Lila Boudahmane of the Paris-Est University, Nicole Buet, Uthaya Sivanantham and Emile Ducarme of Eau de Paris Laboratories, as well as Krista Williams of Virginia Polytechnic Institute and State University for their analytical contribution. We thank also reviewers for their constructive comments and improvement of paper.

REFERENCES

1. Barclay, R., and C. Ratledge. 1983. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J. Bacteriol.* 153:1138-1146.
2. Bodmer, T., E. Miltner, and L. E. Bermudez. 2000. *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiology Letters* 182:45-49.
3. Brooks, R. W., B. C. Parker, H. Grufft, and J. O. Falkinham III. 1984. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. V. Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics. *American Review of Respiratory Diseases* 130:630-633.

4. Chan, K. G. 2009. Exochelin production in *Mycobacterium neoaurum*. *International Journal of Molecular Sciences* 10:345-353.
5. Chapman, J. S., and J. S. Bernard. 1962. The tolerances of unclassified mycobacteria. I. Limits of pH tolerance. *American Review of Respiratory Diseases* 86:582-583.
6. De Groot, M. A., N. R. Pace, K. Fulton, and J. O. Falkinham III. 2006. Relationships between *Mycobacterium* isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7062-7066.
7. Falkinham, J. O. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* 9:763-7.
8. Falkinham, J. O., C. D. Norton, and M. W. LeChevallier. 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1225-1231.
9. George, K. L., and J. O. Falkinham III. 1986. Selective medium for the isolation and enumeration of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Canadian Journal of Microbiology* 32:10-14.
10. Iivanainen, E. K., P. J. Martikainen, M. L. Räsänen, and M. L. Katila. 1997. Mycobacteria in boreal coniferous forest soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23:352-332.
11. Iivanainen, E. K., P. J. Martikainen, P. K. Vaananen, and M. L. Katila. 1993. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:398-404.
12. Kazda, J. 2009. The chronology of mycobacteria and the development of mycobacterial ecology, p. 1-11. In J. Kazda, I. Pavlik, J. O. Falkinham, and K. Hruska (ed.), *The ecology of Mycobacteria: Impact on animal's and human's health*, vol. 1. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
13. Kirschner, R. A., B. C. Parker, and J. O. Falkinham. 1992. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. X. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. *American Review of Respiratory Diseases* 145:271-275.
14. Kirschner, R. A., B. C. Parker, and J. O. Falkinham. 1999. Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:327-332.
15. Marciano-Cabral, F., M. Jamerson, and E. S. Kaneshiro. 2010. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal water utility in the USA. *J. Water Health* 8:71-82.
16. Munsell, A. H. 1907. *Atlas of the Munsell color system*. Malden, Mass, Boston.
17. Nieminen, T., J. Pakarinen, I. Tsitko, M. Salkinoja-Salonen, A. Breitenstein, T. Ali-Vehmas, and P. Neubauer. 2006. 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *J. Microbiol. Methods* 67:44-55.
18. Norby, B., G. T. Fosgate, E. J. B. Manning, M. T. Collins, and A. J. Roussel. 2007. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: Association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Veterinary Microbiology* 224:153-159.
19. Pedley, S., J. Bartram, G. Rees, A. Dufour, and J. A. Cotruvo. 2004. *Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public health consequences, monitoring and management*, vol. 1. World Health Organization titles with IWA Publishing, London.
20. Portaels, F., and S. R. Pattyn. 1982. Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. *American Microbiology (Institut Pasteur)* 133:213-221.
21. Primm, T., C. A. Lucero, and J. O. Falkinham. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:98-106.
22. Radomski, N., F. S. Lucas, R. Moilleron, E. Cambau, S. Haenn, and L. Moulin. 2010. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7348-7351.
23. Rahbar, M., A. Lamei, H. Babazadeh, and S. A. Yavari. 2010. Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. *African Journal of Biotechnology* 9:3618-3621.
24. Reed, C., C. Fordham von Reyn, S. Chumblee, T. V. Ellerbrock, J. W. Johnson, B. J. Marsh, L. S. Johnson, R. J. Trenchel, and C. R. Horsburgh. 2006. Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. *American Journal of Epidemiology* 164:32-40.
25. Santisteban, J. I., R. Mediavilla, E. Lopez-Pamo, C. J. Dabrio, M. B. R. Zapata, M. J. Garcia, S. Castano, and P. E. Martinez-Alfaro. 2004. Loss on ignition: a qualitative or quantitative method for organic matter and carbonate mineral content in sediments? *J. Paleolimnol.* 32:287-299.
26. Sun, Y. C., P. H. Chi, and M. Y. Shine. 2001. Comparison of different digestion methods for total decomposition of siliceous and organic environmental samples. *Anal. Sci.* 17:1395-1399.

RADOMSKI ET AL.

Nontuberculous mycobacteria in soils

27. **Tusseau-Vuillemin, M. H., C. Gourlay, C. Lorgeoux, J. M. Mouchel, R. Buzier, R. Gilbin, J. L. Seidel, and F. Elbaz-Poulichet.** 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* 375:244-256.
28. **van Soolingen, D., P. W. M. Hermans, P. E. W. de Haas, D. R. Soll, and J. D. A. van Embden.** 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2578-2586.
29. **Whan, L., H. J. Ball, I. R. Grant, and M. T. Rowe.** 2005. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7107-7112.
30. **Wolinsky, E., and T. K. Rynearson.** 1968. Mycobacteria in soil, and their relationship to disease-associated strains. *American Review of Respiratory Diseases* 97:1032-1037.

RADOMSKI ET AL.

Nontuberculous mycobacteria in soils

Supplementary table 1: Mean values of triplicate assays of mycobacteria densities, conductivity, pH and contents of moisture, carbon, organic matter and elements in soils sampled in different geographical area. All results are given in dry weight. Argent concentrations were inferior to quantification limits in all the samples.

soil	mycobacteria (copy/g) ^a	conductivity (µS/cm)	pH	moisture (%)	carbon (%) ^b	organic matter (%) ^c	Elements (µg/g) ^a										
							Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn		
peat forest	5.31×10 ⁴	91	3.8	35	51	79	20	0.6	10	16	19	27	9	3	56		
	1.49×10 ⁵	63	3.9	22	21	35	102	<LOQ	15	17	103	148	9	14	45		
	<LOQ	127	6.6	48	18	28	260	0.9	28	16	57	285	15	10	77		
urban woodland	7.61×10 ⁴	100	4.8	32	37	41	174	<LOQ	19	13	149	89	9	6	51		
	<LOQ	58	6.7	17	8	14	74	0.5	59	24	57	33	21	4	67		
	<LOQ	58	7.4	10	3	7	136	0.4	24	8	44	49	7	4	34		
livestock farming field	<LOQ	44	6.3	18	6	14	46	0.4	27	11	32	31	12	5	59		
	<LOQ	22	6.5	16	4	7	40	0.6	39	21	43	37	10	5	72		
	<LOQ	91	6.3	15	3	8	54	0.5	34	18	64	61	23	9	49		
crop farming field	<LOQ	50	6.0	13	3	7	43	0.5	33	17	59	53	22	8	93		
	<LOQ	25	5.8	16	2	8	31	0.4	21	13	40	44	16	7	40		
	<LOQ	108	5.9	19	2	8	39	0.4	26	21	44	53	17	7	55		
lightly urbanized green space	<LOQ	69	7.0	16	1	5	60	1.0	36	17	67	50	23	8	99		
	<LOQ	64	7.4	13	2	6	44	0.6	42	18	73	48	18	10	87		
	<LOQ	66	7.4	11	2	7	47	0.5	27	16	50	52	19	4	74		
lightly urbanized nearcoastal swamp	<LOQ	352	7.0	18	3	9	48	0.5	32	20	59	41	22	6	82		
	<LOQ	152	7.3	12	12	24	45	0.5	20	14	43	68	16	6	85		
	<LOQ	141	7.7	14	6	9	36	0.6	39	11	65	47	10	4	45		
highly urbanized green space	<LOQ	61	7.7	11	2	6	39	0.4	23	14	41	47	15	4	48		
	<LOQ	69	7.2	14	7	13	38	0.5	21	16	38	51	15	9	69		
	5.00×10 ⁶	187	7.5	1	1	5	111	<LOQ	5	2	64	9	1	2	17		
highly urbanized green space	<LOQ	3	7.4	36	4	12	183	<LOQ	7	9	177	18	2	3	57		
	3.53×10 ⁴	1647	7.4	47	3	18	33	<LOQ	47	27	16	26	14	10	31		
	9.82×10 ⁴	4	7.1	8	5	37	33	<LOQ	13	14	45	10	5	7	32		
highly urbanized green space	<LOQ	100	7.8	20	2	8	35	0.6	31	54	41	50	21	9	104		
	<LOQ	22	7.9	20	1	3	38	0.5	35	13	39	44	21	22	69		
	<LOQ	68	7.9	19	4	6	122	0.5	29	25	128	36	16	47	107		
	<LOQ	94	8.3	17	3	5	29	0.5	25	18	30	35	15	43	87		

^a LOQ: limit of quantification, ^b particulate organic carbon (%), ^c loss on ignition at 550°C (%)

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

Mycobacteria density decreases in surface water of urban, peri-urban and rural areas during storm weather

Nicolas Radomski^{1*}, Emmanuelle Cambau², Sophie Haenn³, Laurent Moulin³, Régis Moilleron¹, Françoise S. Lucas¹

Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France¹; Université Paris Diderot, Hôpital Saint Louis AP-HP, Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, FR 75475 Paris, France²; Eau de Paris, Direction Recherche et Développement Qualité de l'Eau (DRDQE), 33 avenue Jean Jaurès, FR 94200 Ivry sur Seine, France³

Literature showed that nontuberculous mycobacteria (NTM) density in surface waters can be explained by high levels of cumulated pluviometry and organic matter amount in water, and emphasized consequently that mycobacteria from soils can be brought in surface waters due to rain runoff from rural areas. However, the behavior of mycobacteria in surface waters has never been studied neither in urban areas nor during a storm so far. Consequently, we sampled urban, peri-urban and rural areas in order to study NTM density at the scale of a river and its tributaries. During the storm, which was slightly intense (6.6 mm/h of cumulated rain during 5.5 h), mycobacteria density in rural, peri-urban and urban areas, estimated at $2.16 \times 10^5 \pm 2.36 \times 10^5$ copies/L of surface water in 20.8% of the samples, decreased under the level of detection. NTM densities were significantly explained by both the cumulated pluviometry ($p = 0.002$) and the storm duration ($p = 0.011$), whereas turbidity which is often associated with organic matter amount did not explain mycobacteria density in surface water ($p > 0.100$). In spite of NTM input by nonpoint sources from water run-off from urban, peri-urban, and urban surfaces, a dilution phenomenon due to runoff during this storm decreased NTM densities under the detection limit. These results showed that a slightly intense and long rain event decreased mycobacteria density in surface water, whereas literature showed that cumulated high storms favored an increase of mycobacteria density in surface water owing to rain runoff. Our results emphasized the importance of hydrology and land use in order to understand NTM ecology.

Key words: Mycobacteria; runoff; real-time qPCR; dilution phenomenon

It is generally accepted that environmental water (7, 21) and soils are potential vectors of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections (24, 32) in humans (24) and animals (19), but the knowledge about their ecological niche in terrestrial and aquatic habitats remains still poor. NTM can multiply in rural soils, especially those presenting low pH in brown swamp (8), boreal forest (17), mud, sandy till, sawmill or sphagnum peat (16), and also in the urban soils, particularly those contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a specific pollutant of urbanized areas (4). More precisely, previous studies revealed that NTM are able to proliferate in humic- and fulvic-rich, acidic, micro-aerobic environments (14), and that the bioavailability of PAHs seems to control their community structures (26) mainly in the clay fraction (25) of acidic or neutral soils (27). Indeed, probably using an aromatic ring-hydroxylating dioxygenase (5), several NTM species (6, 10, 11, 13, 15, 29, 31), are able to grow in PAH contaminated soils by degrading fluoranthene, phenanthrene, pyrene, fluorene, anthracene, chrysene, nitropyrene or biphenyl as a source of carbon and energy. In addition, NTM presence in surface water seems to be correlated positively with the presence of peatlands, precipitation data (cumulative precipitation for the 3 weeks before each sampling), chemical oxygen demand, and concentrations of Fe, Al, Cu, Co, and Cr, and negatively with pH in Finland (12), and NTM was also shown to survive in the alkaline conditions of the Rio Grande surface waters (3). Previous studies focusing on cattle ranches, showed that NTM positive cultures from soils of livestock farming areas were significantly associated with lower pH value and calcium as well as higher Fe, Zn and Mn contents (18), and that runoff from contaminated pastures can be contaminated by NTM (20). Consequently, some rural and urban soils, which are favorable for NTM growth, might be washed off during storms and runoff might carry NTM straight to surface waters in watersheds, as it was observed concerning surface water running through peat lands (12).

*Correspondence: Nicolas Radomski, Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France; email: nicolas.radomski@leesu.enpc.fr; tel: +33(0)666665536; fax: +33(0)145171627

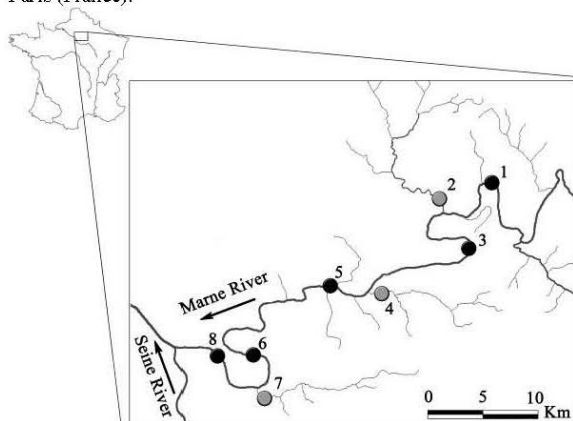
Although it is important to evaluate the relative impact of rain runoff from urban and rural areas in order to understand NTM behavior during storms, NTM densities in urban surface water and NTM behavior during storms were rarely studied. The knowledge of NTM behavior in runoff from urban and rural areas has broad implication for water management, including the identification of areas the most susceptible to impact the quality of surface waters in the watershed, guidance in bioremediation efforts, and in surveys of environmental pathogen reservoirs. As a consequence, the aim of this study was to evaluate the impact of a storm on NTM densities in surface waters from rural, peri-urban and urban areas using a recently described real-time PCR method for mycobacteria enumeration (22). The Marne River and three of its tributaries were sampled before, during and after a rain event. NTM densities were also compared to physico-chemical parameters that are usually monitored in surface water in order to understand the factors that affect NTM temporal and spatial distribution.

MATERIALS and METHODS

Sampling of surface waters. We studied a section of the Marne River, located at the East of Paris in France (Fig. 1). The Marne River is a tributary of the Seine River, and is generally considered as a 6th order river according to the Strahler classification (2). The Marne River and three of its major tributaries, namely the Beuvronne, Gondoire, and Morbras Rivers, were monitored. At each location, water was sampled in surface (first meter deep). For each sample, 1-liter of surface water was collected using clean bucket, transferred in glass bottle used for bacterial analyses (Schott Duran), transported to the laboratory within 6 h, and processed immediately after they arrived at the laboratory. The sampling campaigns were carried out the 18th September 2009 concerning dry weather, and during the storm of the 5th and 6th October 2009. This storm followed a long dry period; as a consequence soils have not been washed before the sampling campaigns. Moreover, in order to focus on the impact of rain runoff, we performed the sampling campaigns in sections of the Marne River and its tributaries which were as much as possible not impacted by potential NTM point sources such as water discharges from wastewater treatment plant (1, 30).

RADOMSKI ET AL.

FIG. 1. Sampling of surface water in the Marne River (black circles), at Tribardou (site 1), Chalifert (site 3), Gournay (site 5), Champigny (site 6) and Charentonneau (site 8), and in the major tributaries (grey circles) namely Beuvronne (site 2), Gondoire (site 4) and Morbras (site 7) Rivers. Sampling sites were located along the Marne River from upstream to downstream and are located in rural area (sites 1, 2 and 3), lightly populated peri-urban area (site 3, 4 and 5) and populated urban area (site 6, 7 and 8) in the neighborhood of Paris (France).



In addition, we chose to study three different runoff areas, such as the densely populated urban area downstream from the Marne River, a rural area upstream from the Marne River and a central area considered as a lightly urbanized peri-urban area (Fig. 1). These studied areas correspond to one of the largest urban agglomeration in the world: the Paris conurbation with about ten million inhabitants surrounded by an intensive agriculture area which is constituted by arable lands, grasslands and forests (2). The aim of this study was to evaluate the impact of rain runoff on NTM densities in the Marne River and its major tributaries. Consequently surface water was sampled before, during and after a rain event at eight different locations: the three major tributaries of each studied area as well as in Marne River upstream and downstream from the confluence with each tributary (Fig. 1) ($n=48$). Each point was sampled six times at approximately the same hour before, during and after the storm until flows of the tributaries return to their initial stat. It must be noticed that the sampling sites downstream from each confluences were far enough from each tributary plumes in order to study samples representing merged flows.

Mycobacteria densities. Samples were concentrated and mycobacterial DNA was extracted using previously described procedures (28) and four successive purification steps were conducted (v:v) using phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1). The aqueous phase was then recovered using Phase Lock Gels™ (5 Prime), whereas DNA was precipitated with isopropanol (v/v) and washed with cold ethanol at 70%.

Nontuberculous mycobacteria from rain runoff

Dried DNA pellet was dissolved in TE buffer (10 mM Tris pH 7.6; 1 mM EDTA) and three 10-fold dilutions were performed in TE buffer in order to avoid PCR inhibitions due to high DNA concentrations. Following the real-time quantitative PCR method that we previously published (22), mycobacterial genome copies were estimated using *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752^T strain DNA as standard (5-fold dilutions), 110F forward primer (900 nM), I571R reverse primer (300 nM), H19R probe (50 nM) labelled with the fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein on 5' end and Black Hole Quencher on the 3' end (Eurogentec), qPCR MasterMix plus low 6-carboxy-X-rhodamine (Eurogentec), and ABI 7500 real-time PCR system with SDS software (Applied Biosystems). Correlation coefficient of the standard curve was controlled and measured as previously described at $98.6 \pm 0.2\%$ (22).

Physico-chemical parameters. Dissolved oxygen, pH and temperature were measured *in situ* using a dissolved oxygen probe CelloX 325 (WTW) as well as a pH combined electrode with integrated temperature probe SenTix 41 (WTW) both connected to a universal pocket sized meter MultiLine P4 (WTW). Water turbidity was measured *in situ* using portable turbidimeter 2100P (Hach). In order to estimate the storm intensity, conductivity, which is known to decrease during wet seasons (9), was measured *in situ* using standard conductivity cell TetraCon® 325 (WTW) connected to a universal pocket sized meter MultiLine P4 (WTW). Pluviometry was measured by Paris-Montsouris meteorological office (France) which is available at the 'Observatoires, Prévisions, Modèles En Temps Réel' website (<http://www.meteociel.fr>).

Statistical analyses. Generalized linear model (GLM) analyses were carried out using the Statgraphics Plus 5.1 software (Manugistics).

RESULTS

Storm intensity. The sampling campaigns lasted 21.2 h. During the storm, the rainfall intensity reached 6.6 mm/h in about 5.5 h and stayed stable during 16 h. The intensity of this storm was considered as low because the conductivity (GLM, $F=1.68$, $df=1$, $n=48$, $p=0.201$) and dissolved oxygen (GLM, $F=0.79$, $df=1$, $n=28$, $p=0.387$) of the surface water measured before and during the event did not decrease significantly but stayed stable at about $525 \pm 167 \mu\text{S}/\text{cm}$ and $9.8 \pm 5.8 \text{ mg}/\text{L}$, respectively.

Factors explaining NTM density. All sampling sites taken into account, NTM density was estimated at $2.16 \times 10^5 \pm 2.36 \times 10^5$ copies/L in 20.8% of the samples ($n=48$). More precisely, NTM density was estimated at $3.78 \times 10^5 \pm 3.21 \times 10^5$ copies/L in 50.0% of the samples ($n=8$) before rain start and $1.08 \times 10^5 \pm 5.86 \times 10^4$ copies/L in 15.0% of the samples ($n=40$). Concerning the rural area, high levels of NTM were found in the surface water of the Marne River upstream from the confluence with the Beuvronne River (site 2) before the rain start and between 4 h and 12 h after the rain start but were neither detected in the Beuvronne River nor in the Marne River downstream from the confluence (Table 1).

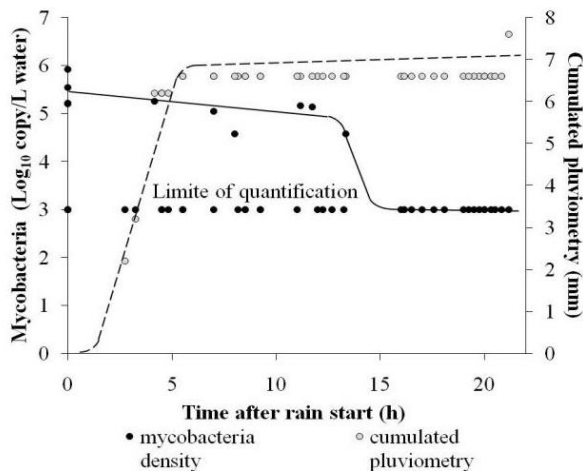
TABLE 1. Mycobacterial densities in surface water of the Marne River at Tribardou (site 1), Chalifert (site 3), Gournay (site 5), Champigny (site 6) and Charentonneau (site 8), and in its major tributaries: the Beuvronne (site 2), the Gondoire (site 4) and the Morbras (site 7) Rivers during a storm event

Sampled area	Rain start	Mycobacteria densities in surface water ^a		
		Upstream	Tributary	Downstream
Rural (upstream from Marne River)	before	site 1 5.22 (1/1)	site 2 ND (0/1)	site 3 ND (0/1)
	after	4.99 ± 0.36 (3/5)	ND (0/5)	ND (0/5)
	detection	4.2-11.8	N/A	N/A
Peri-urban (central area of Marne River)	before	site 3 ND (0/1)	site 4 5.20 (1/1)	site 5 ND (0/1)
	after	ND (0/5)	ND (0/5)	5.10 ± 0.08 (2/5)
	detection	N/A	N/A	7.0-11.2
Urban (downstream from Marne River)	before	site 6 ND (0/1)	site 7 5.54 (1/1)	site 8 5.92 (1/1)
	after	ND (0/5)	ND (0/5)	4.58 (1/5)
	detection	N/A	N/A	13.3

^a mycobacteria density is expressed in log₁₀ copy/L ± SD, No. of positive samples over No. of tested samples is in brackets, and instant of detection is expressed in decimal hour. The quantification limit of mycobacteria was estimated at about 3 log₁₀ copies/L.

In the densely and moderately populated urban and peri-urban areas, no NTM were detected in the Marne River upstream from the confluences with the Gondoire (site 4) and the Morbras (site 7) tributaries, whereas high NTM densities were measured in the Gondoire and the Morbras Rivers during the dry weather, as well as 7.0 h and 13.3 h after the rain start (Table 1). All sampling sites taken into account, cumulated pluviometry (p = 0.002) and time after rain start (p = 0.011) were significantly associated with NTM density measured in surface waters. Surface water conductivity (525 ± 167 µS/cm), dissolved oxygen (9.8 ± 5.8 mg/L), turbidity (25.0 ± 23.2 NTU), pH (7.4 ± 0.5) as well as sampling sites (site 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8), river type (Marne or tributary), runoff area (urban area, peri-urban or urban areas) and surface water temperature did not significantly explained NTM densities during the storm. Indeed, all sites confounded, NTM densities reached a density estimated at 5.22 ± 0.34 log₁₀ copy/L in 50.0% of the samples (n = 8) before the rain start, and 5.47 ± 0.30 log₁₀ copy/L in 25.0% of the samples (n = 24) during the first 13.3 h of the storm (Table 1), but NTM were never detected thereafter (n = 16), i.e. between the 16th and 21th hour after rain start (Fig. 2).

FIG. 2. Variation of mycobacterial densities in surface water of the Marne River and its tributaries (full line) according to cumulated pluviometry during a storm event (dotted line). The quantification limit of mycobacteria was estimated at about 3 log₁₀ copies/L.



DISCUSSION

Although pluviometry may play a major role concerning NTM ecology (12), the spatial and temporal distribution of NTM in rivers during storms has hardly been studied. To our knowledge, our paper is the first to report NTM densities that are estimated in river surface waters from rural, peri-urban and urban areas at the scale of a storm. Interestingly, our results focusing before, during and after a storm event are in accordance with the results of Iivanainen *et al.* (1993), who estimated that more than 23% of the surface water samples were constituted of more than 1.00 × 10³ NTM/L whatever the weather conditions (12). Indeed, in our study the levels of NTM reached up to 2.16 × 10³ ± 2.36 × 10⁵ copies/L in 20.8% of the samples (n = 48) before, during and after a rain event. However after the storm event (i.e. between the 16th and 21th hour after rain start), no NTM could be detected from the surface waters of the studied rivers.

Impact of sampling area on NTM density. Our results showed that in rural area NTM density can be high in surface water (Table 1). These results are in accordance with previous studies (3, 18, 20), which showed that surface water of rural areas can be contaminated with NTM during dry and wet weather. Whereas previous studies focused on acidic soils and surface waters (12, 18), or alkaline surface waters in the Rio Grande River (3), our results showed that high NTM densities could also be found in neutral surface water (pH 7.4 ± 0.5). These results imply that NTM multiply in a wide range of pH, or that these high NTM densities in neutral rural rivers result from leaching from acidic environments (soils or marshes). However in our study, high NTM densities were estimated from the Marne River and from several of its tributaries before the rain event, after a long period of dry weather. As a consequence the measured NTM densities should not be resulting from rain runoffs from acidic environments but from other sources.

Moreover, our study is the first one to show that NTM densities in urban area are as high as NTM densities in rural area (Table 1). NTM nonpoint sources are present in urban area, as for example PAH contaminated surfaces whose bioavailability allows the growth of NTM (14, 25-27). This PAH bioavailability should be taken into account in the future studies of NTM ecology. Point sources such as non-treated waste-water discharges may also contribute to NTM densities in urbanized areas.

Impact of the tributaries on NTM density. A previous study showed that cumulated precipitations at three weeks and chemical oxygen demand, which refers to organic matter amount, explained NTM density in surface water (12). Our study confirms the relationship between NTM densities and precipitation data. The NTM densities in the Marne River and its tributaries were correlated with the cumulated pluviometry and the time after rain start. In contrast, our results do not confirm the relationship with organic matter amount, since we did not found any correlation between NTM density

RADOMSKI ET AL.

Nontuberculous mycobacteria from rain runoff

and turbidity (25.0 ± 23.2 NTU) during storm, although it is known that hydrophobicity cell wall of NTM explains their affinity with organic matter in environment (23). The difference with the results of Iivanainen *et al.* (12) could be explained by the low intensity of the event we sampled (6.6 mm/h of cumulated rain during 5.5 h) which was not sufficient to increase significantly the organic matter amount in the Marne River surface water, while in the paper of Iivanainen *et al.* (12) strong storms were sampled. In our case, organic matter was certainly brought by rain runoff from the soils to the surface water but also highly diluted into this one.

Our results showed that, in the rural area, the Marne River upstream from the Beuvronne confluence (site 1) was contaminated by NTM before the rain, but not downstream, neither inside the tributary itself. Consequently, during dry weather the Beuvronne flow seems to dilute the NTM densities in the surface water of the Marne River. NTM remained undetected during the whole storm event inside the tributary and downstream from the confluence with the Marne River (Table 1). As a consequence, the rain runoff did not seem to increase significantly the NTM densities. In addition, NTM was detected between 4.2 h and 11.8 h in the Marne River upstream from the Beuvronne confluence, but at the end of the rain fall (i.e. after 11.8 h) NTM were not anymore detected (Table 1). Thus rain runoffs upstream from the confluence seemed to dilute the NTM densities.

In contrast in the urban and peri-urban areas, both the Gondoire (site 4) and the Morbras Rivers (site 7) were contaminated by NTM during dry weather, while no NTM were detected in the Marne River upstream from the confluences with these two tributaries. However, the impact of the two tributaries on the Marne River downstream from the confluence differed.

It seemed that the Gondoire River did not impact the Marne River NTM levels, as no NTM were detected downstream from the confluence. In contrast, the Morbras River seemed to impact the Marne River microbial quality, since the NTM densities in the Marne River increased after the confluence with the Morbras River.

During the storm event, the level of NTM in the urban and peri-urban tributaries (the Gondoire and Morbras Rivers) quickly (4.2 h) dropped under the detection limit (Table 1). It seems that the rain runoff diluted the NTM densities inside the two tributaries. However, the high levels of NTM in the Marne River downstream from both confluences remained high until 11.2 h (Gondoire River: site 5) and 13.3 h (Morbras River: site 7) after the rain start, and dropped later under the detection limit (Table 1). These results could suggest that the higher flows in the Marne, Gondoire and Morbras Rivers did not immediately dilute the downstream NTM densities, due to the time response delay of the watershed. It seemed that this time delay was shorter inside the tributaries (< 4 h) and longer inside the Marne River (> 11 h) (flow data not shown). It could also mean that the high NTM densities downstream from the Gondoire confluence and maybe also downstream from the Morbras confluence were also due to other NTM nonpoint or point sources between the upstream and downstream sampling sites, which were not considered in our sampling strategy (Fig. 1). However, these potential unidentified sources were also diluted after 11.2-13.3 h.

In conclusion, this study showed that rivers in urban, peri-urban and rural areas carried high levels of NTM in their surface waters during dry weather and that the peri-urban tributaries may impact the main rivers. During storm events, in spite of the NTM input from point and nonpoint sources from rural, peri-urban and urban areas, a dilution phenomenon lowered the NTM densities in the tributaries and the main river under the detection limit with a shorter time response for the tributaries (Fig. 2). This dilution effect remained several hours after the end of the rain fall (at least 16 to 21 hours after the rain start). These results emphasized the importance of the hydrology in order to understand NTM ecology, and especially to study their nonpoint sources during dry and wet weather.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the PIREN-Seine program (<http://www.sisyphes.upmc.fr/piren/>), by the OPUR program (<http://leesu.univ-paris-est.fr/opus/>), and by a grant from STEA (Service Technique de l'Eau et de l'Assainissement) of City of Paris. We are grateful to Jean Marie Mouchel and all the members of Sisyphes laboratory: Structure and functioning of continental hydrosystems at University of Pierre and Marie Curie (Paris), for their help concerning sampling campaigns.

REFERENCES

- Berekaa, M. M., and A. Steinbüchel. 2000. Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4462-4467.
- Billen, G., J. Garnier, J. M. Mouchel, and M. Silvestre. 2007. The Seine system: Introduction to a multidisciplinary approach of the functioning of a regional river system. *Science of The Total Environment* **375**:1-12.
- Bland, C. S., J. M. Ireland, E. Lozano, M. E. Alvarez, and T. P. Primm. 2005. *Mycobacterial ecology of the Rio Grande*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5719-5727.
- Bradley, L. J. N., B. H. Magee, and S. L. Allen. 1994. Background levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and selected metals in New England urban soils. *Journal of Soil Contamination* **3**:1-13.
- Brezna, B., A. A. Khan, and C. E. Cerniglia. 2003. Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp. *FEMS Microbiology letters* **223**:177-183.
- Derz, K., U. Klinner, I. Schphan, E. Stackebrandt, and R. M. Kroppenstedt. 2004. *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:2313-2317.
- Falkinham, J. O. 2003. *Mycobacterial aerosols and respiratory disease*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:763-7.
- Falkinham, J. O. 2009. Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology* **107**:356-367.
- Flora, M. D., and P. C. Rosendahl. 1982. The response of specific conductance to environmental conditions in the everglades national park, Florida. *Water, Air, and Soil Pollution* **17**:51-59.
- Hennessee, C. T., J. S. Seo, A. M. Alvarez, and Q. X. Li. 2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:378-387.
- Hornisch, D., I. Brost, G. W. Kohring, F. Giffhorn, R. M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt, P. Färber, and W. H. Holzapel. 2004. *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **27**:653-660.
- Iivanainen, E. K., P. J. Martikainen, P. K. Vaananen, and M. L. Katila. 1993. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:398-404.
- Khan, A. A., S. J. Kim, D. D. Paine, and C. E. Cerniglia. 2002. Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1997-2002.
- Kirschner, R. A., B. C. Parker, and J. O. Falkinham. 1999. Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:327-332.
- Kleespies, M., R. M. Kroppenstedt, F. A. Rainey, L. E. Webb, and E. Stackebrandt. 1996. *Mycobacterium hodleri* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:683-687.
- Nieminen, T., J. Pakarinen, I. Tsitko, M. Salkinoja-Salonen, A. Breitenstein, T. Ali-Vehmas, and P. Neubauer. 2006. 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *J. Microbiol. Methods* **67**:44-55.
- Niva, M., A. Hernesmaa, K. Hahtela, M. Salkinoja-Salonen, K. Sivonen, and K. Haukka. 2006. Actinobacteria communities of boreal forest soil and lake water are rich in mycobacteria. *Boreal Environment Research* **11**:45-53.
- Norby, B., G. I. Fosgate, E. J. B. Manning, M. T. Collins, and A. J. Roussel. 2007. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: Association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Veterinary Microbiology* **224**:153-159.

RADOMSKI ET AL.

Nontuberculous mycobacteria from rain runoff

19. Pedley, S., J. Bartram, G. Rees, A. Dufour, and J. A. Cotruvo. 2004. Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public health consequences, monitoring and management, vol. 1. World Health Organization titles with IWA Publishing, London.
20. Pickup, R. W., G. Rhodes, J. Bull, S. Arnott, K. Sidi-Boumedine, M. Hurley, and J. Hermon-Taylor. 2006. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: Diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4067-4077.
21. Primm, T., C. A. Lucero, and J. O. Falkinham. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:98-106.
22. Radomski, N., F. S. Lucas, R. Moïlleron, E. Cambau, S. Haenn, and L. Moulin. 2010. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7348-7351.
23. Radomski, N., R. Moïlleron, F. S. Lucas, and J. O. Falkinham III. 2010. Challenges in environmental monitoring of pathogens: Case study in *Mycobacterium avium*. In A. Méndez-Vilas (ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2. Formatex Research Center, Badajoz.
24. Reed, C., C. Fordham von Reyn, S. Chamblee, T. V. Ellerbrock, J. W. Johnson, B. J. Marsh, L. S. Johnson, R. J. Trenchel, and C. R. Horsburgh. 2006. Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. *American Journal of Epidemiology* 164:32-40.
25. Uyttendaele, M., P. Breugelmans, M. Janssen, P. Wattiau, B. Joffe, U. Karlson, J. J. Ortega-Calvo, L. Bastiaens, A. Ryngaert, M. Hausner, and D. Springael. 2006. *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. *Environmental Microbiology* 8:836-847.
26. Uyttendaele, M., A. Spoden, J. J. Ortega-Calvo, K. Wouters, P. Wattiau, L. Bastiaens, and D. Springael. 2007. Differential responses of *Eubacterial*, *Mycobacterium*, and *Sphingomonas* communities in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. *Journal of Environmental Quality* 36:1403-1411.
27. Uyttendaele, M., S. Vermeir, P. Wattiau, A. Ryngaert, and D. Springael. 2007. Characterization of cultures enriched from acidic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3159-3164.
28. van Soelingen, D., P. W. M. Hermans, P. E. W. de Haas, D. R. Soll, and J. D. A. van Embden. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2578-2586.
29. Wang, R. F., A. R. Jefferson, and M. A. Pickard. 1998, posting date. *Mycobacterium anthracenicum*: PAH-degrading strain, isolated by Saowanit Tongpim GenBank NCBI. [Online.]
30. Whan, L., H. J. Ball, I. R. Grant, and M. T. Rowe. 2005. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7107-7112.
31. Willumsen, P., U. Karlson, E. Stackebrandt, and R. M. Kroppenstedt. 2001. *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1715-1722.
32. Yoder, S., C. Argueta, A. Holtzman, T. Aronson, O. G. W. Berlin, P. Tomasek, N. Glover, S. Froman, and G. Stelma. 1999. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2650-2653.

III / Conclusion

L'étude de la WWTP de Seine-Centre en temps sec a permis de confirmer que l'eau usée est bien une source ponctuelle de NTM et que la station étudiée semblait ne pas rejeter de NTM détectables dans l'eau de surface (chapitre III §II.1 / article ④). En effet, les NTM ont atteint $5,52 \times 10^5 \pm 3,97 \times 10^5$ copies/L dans l'eau en entrée de WWTP (84 % d'échantillons positifs) et n'ont pas été détectées dans l'eau en sortie de WWTP après décantation physico-chimique et biofiltration. Par ailleurs, cette étude a permis d'estimer la densité de NTM à $1,04 \times 10^6 \pm 1,75 \times 10^6$ copies/g dans les boues de cette WWTP (50 % d'échantillons positifs). Ces boues sont en l'occurrence incinérées par cette WWTP et ne semblent donc pas présenter de risques infectieux. Néanmoins, ce résultat souligne que l'étude des NTM dans les filières de traitement des boues de WWTP est nécessaire pour assurer l'élimination de ces microorganismes potentiellement pathogènes avant épandage des boues traitées sur les sols ruraux. De plus, le comportement des NTM s'est avéré hydrophobique *a contrario* des indicateurs fécaux *E. coli* et entérocoques intestinaux dont les comportements étaient respectivement hydrophile et intermédiaire. Effectivement, la plupart des NTM (98 ± 2 %, correspondant à $2,45 \pm 0,78 \log_{10}$) ont été éliminées par décantation physico-chimique et les NTM restantes ($0,74 \times 10^4 \pm 1,40 \times 10^4$ copies/L) ont été éliminées par biofiltration (53 % d'échantillons positifs). Même si les densités de NTM mesurées furent significativement inférieures aux densités de ces indicateurs fécaux, ces derniers ne semblent donc pas permettre de prédire le comportement des NTM en WWTP. Par ailleurs, il est probable que des NTM soient rejetées dans les eaux de surface lorsque les WWTP ne peuvent pas traiter complètement les eaux usées en raison de débits trop forts comme aux cours d'évènements pluvieux intenses.

Concernant les études indirectes de l'impact du ruissellement, la nature du sol (chapitre III §II.2 / article ⑤) ainsi que l'effet de dilution des NTM dans les eaux de surface provoqué par les événements pluvieux (chapitre III §II.3 / article ⑥) semblent affecter les densités de NTM dans les eaux de surface. Ainsi, les densités de NTM les plus importantes ont été mesurées dans des sols de forêts tourbeuses ($9,27 \times 10^4 \pm 5,00 \times 10^4$ copies/g sec) et dans des sols faiblement urbanisés proches de marécages côtiers ($1,71 \times 10^6 \pm 2,85 \times 10^6$ copies/g sec), alors qu'aucune NTM n'a été détectée dans les autres types de sols testés (chapitre III §II.2 / article ⑤). Les NTM détectées dans les sols péri-urbains pourraient soit être présentes et se développer dans ce type de sol, soit provenir des marais côtiers via le ruissellement et contaminer sporadiquement ces sols péri-urbains. Les sols forestiers et marécageux sembleraient donc être propices au développement des NTM et c'est en ce sens qu'ils pourraient être considérés comme des habitats naturels de NTM présentant des valeurs faibles de pH et des teneurs fortes en humidité, matière organique et fer. Lors d'évènements pluvieux, les sols ruraux avec de l'élevage, ou bien des sols forestiers et marécageux peuvent impacter les eaux de surface via le ruissellement. Toutefois, l'étude qui a estimé la densité de NTM à $2,16 \times 10^5 \pm 2,36 \times 10^5$ copies/L dans environ 20 % des échantillons d'eau de surface de la Marne et de ces affluents majeurs en temps sec et pendant un événement pluvieux, a démontré des apports à la fois de zones rurales et forestières et des apports d'un affluent (le Morbras) qui présente dans sa partie aval des zones péri-urbaines fortement urbanisées et des zones d'agriculture dans sa partie amont (chapitre III §II.3 / article ⑥). Le Morbras est globalement de mauvaise qualité écologique et microbiologique, essentiellement impacté par des rejets urbains de temps de pluie, le réseau étant unitaire à 20 %. Toutefois il existe de nombreux mauvais raccordements entre le réseau pluvial et le réseau d'eaux usées, ces eaux usées non traitées pouvant constituer une source comme nous l'avons vu avec les eaux en entrée de la WWTP Seine-Centre.

Contrairement à l'estimation de la densité de NTM dans l'eau usée (chapitre III §II.1 / article ④), l'évaluation de cette densité dans l'eau de ruissellement ne peut pas se faire directement sur les prélèvements en raison de la difficulté d'échantillonnage. Aussi nous

avons opté pour une estimation de l'impact des ruissellements en passant par l'estimation de la densité des NTM dans l'eau de surface par temps de pluie. Concernant les NTM, il est apparu que la pluviométrie et la durée de l'événement expliquaient la diminution du nombre de NTM détectées dans l'eau de surface au cours d'événements pluvieux (chapitre III §II.3 / article ③). Ainsi, les ruissellements des zones péri-urbaines et rurales ne semblent pas augmenter la densité de NTM dans l'eau de surface en raison d'un phénomène de dilution (chapitre III §II.3 / article ③). Ces études constituent une première approche, qui demanderait à être confirmée par des échantillonnages supplémentaires lors de plusieurs événements pluvieux, et d'échantillonner des eaux de ruissellement provenant de sols naturellement riches en mycobactéries afin de valider ces hypothèses.

De façon générale, les incertitudes de mesures présentées précédemment et estimées à environ 1 log sont en accord avec l'estimation du rendement d'extraction d'ADN variant de 1 % à 33 %. Cette estimation du rendement d'extraction d'ADN est en accord avec la littérature (Frostegård *et al.* 1999). Toujours en accord avec la littérature (chapitre I§I.3.a / et I.3.b /), la distribution des NTM dans l'environnement est apparue quantitativement faible avec environ 19 % des prélèvements positifs au total (n=238), mais qualitativement très diversifiée de par la nature variable des échantillons positifs. Cette diversité des sources probables des NTM pourrait signifier que certaines d'entre elles sont spécifiques de certaines espèces. De plus, l'existence d'espèces saprophytes et d'espèces pathogènes, souligne que le développement de méthodes distinguant les espèces de NTM permettrait de déterminer si les sources des NTM sont caractéristiques de certaines espèces. Néanmoins, la diminution de la limite de quantification de la méthode employée semble être la priorité. Effectivement, en accord avec l'estimation de la limite de quantification de la méthode de PCR en temps réel développée (chapitre II §II.2 / article ②) et du rendement d'extraction d'ADN mycobactérien de la procédure sélectionnée (chapitre II §II.3 / article ③), la distribution gaussienne de la proportion d'échantillons positifs en fonction de la concentration en NTM mesurée, souligne une limite de quantification d'environ 3 log avec, en de rares occasions, des estimations à environ 2 log (Figure 15). Ainsi, après diminution de la limite de quantification il serait possible d'étudier plus spécifiquement la capacité de multiplication des NTM dans l'eau et le sol. Ceci pourrait être effectué en quantifiant l'évolution d'un plasmide instable à chaque multiplication comme cela a été récemment proposé pour étudier la réplication de *M. tuberculosis* (Gill *et al.* 2009).

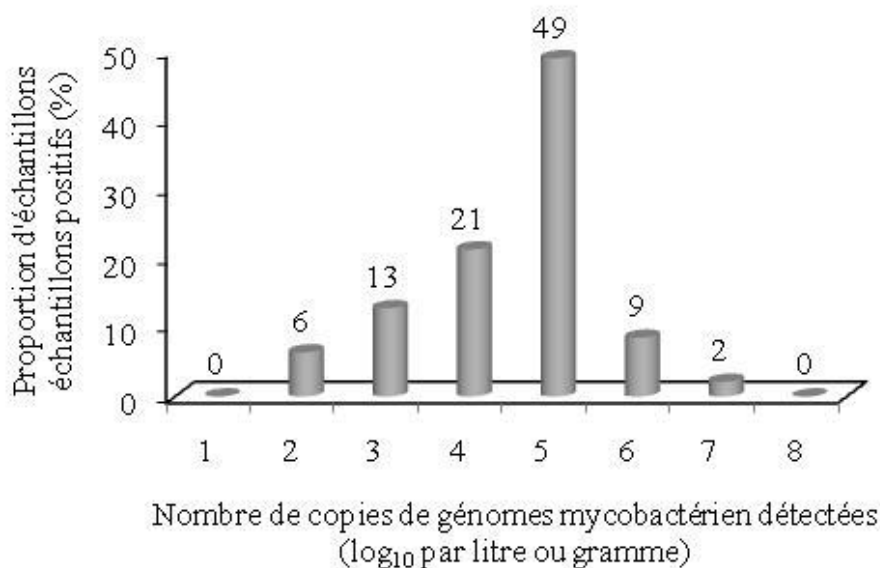


Figure 15 : Distribution des échantillons quantifiables (19 %) en fonction de leurs concentrations en mycobactéries, estimées par PCR en temps réel dans l'ensemble des prélèvements (47 positifs sur 238)

« Un expert est une personne qui a fait toutes les erreurs qui peuvent être faites dans un domaine très étroit »

Niels Bohr

CHAPITRE IV : VOIES D'AMÉLIORATION POUR L'ÉTUDE DES PATHOGÈNES ENVIRONNEMENTAUX ; CAS DES MYCOBACTÉRIES

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

I/ Introduction

L'état de l'art sur les mycobactéries dans les bassins versants, nous indique qu'une multitude d'outils analytiques est à notre disposition pour étudier les NTM dans l'environnement par bactériologie, biochimie, biologie moléculaire et physico-chimie (chapitre I §II /). Néanmoins, ces outils analytiques de détection, de quantification (chapitre I §II.1 /), d'identification (chapitre I §II.2 /) et de caractérisation (chapitre I §II.3 /) ne permettent pas de répondre aux mêmes objectifs (chapitre I §II /) et ne sont pas tous applicables en l'état à des échantillons de l'environnement en raison de leurs degrés de spécificité, de sensibilité, d'efficacité et de reproductibilité (chapitre II §II.1 / , §II.2 / et §II.3 /). Il a donc été entrepris d'explorer de nouvelles voies d'amélioration des stratégies et outils d'étude des NTM dans l'environnement. Le présent chapitre est organisé en deux parties présentées sous formes d'articles. Le premier de ces articles est un chapitre de livre publié dans *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, et le second n'a pas encore été soumis à publication.

Article ⑦ Radomski N., R. Moilleron, F.S. Lucas et J.O. Falkinham III (2011). Challenges in environmental monitoring of pathogens: Case study in *Mycobacterium avium*. A. Méndez-Vilas Eds. Badajoz, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2(2): 1551-1561 (ISBN 13: 978-84-614-6195-0).

Dans ce chapitre de livre, l'applicabilité et l'intérêt des méthodes analytiques de suivi dans l'environnement des NTM (chapitre I §II /), en particulier la plus responsable de pathologies chez l'homme : *M. avium* (chapitre I §I.2.c /), sont comparées dans l'objectif de proposer un schéma dichotomique de décision des outils à mettre en œuvre en vue de surveiller ce microorganisme pathogène dans l'environnement en fonction du panel de méthodes analytiques proposé dans la littérature (chapitre IV §II.1 / article ⑦).

Article ⑧ Radomski N., F. Veyrier, E. Cambau, R. Moilleron, L. Moulin, M.A. Behr, F.S. Lucas (2010). New strategy for *in silico* identification of exclusively conserved sequences in *Mycobacterium* spp. genomes.

Les cibles moléculaires de détection des mycobactéries avaient été proposées sur la base des connaissances des gènes *rrs*, *gyrA*, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB*, *sodA* et de l'ITS 16S-23S, qui étaient et sont encore utilisés dans des objectifs d'identification. Cependant, ces cibles moléculaires sont soit très sensibles mais peu spécifiques, soit très spécifiques mais peu sensibles (chapitre II §II.2 /). En conséquence, nous proposons dans cet article une nouvelle stratégie *in silico* d'identification de protéines conservées exclusivement au sein des génomes mycobactériens dans un objectif de développement d'outils moléculaires totalement sensibles et spécifiques (chapitre IV §II.2 / article ⑧).

II / Travaux entrepris

II.1 / Les défis de la surveillance des pathogènes environnementaux : Etude de cas de *Mycobacterium avium* (publié en décembre 2010 dans *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*)

Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology
A. Méndez-Vilas (Ed.)

Challenges in Environmental Monitoring of Pathogens: Case Study in *Mycobacterium avium*

N. Radomski¹, R. Moilleron¹, F. S. Lucas¹, and J. O. Falkinham III²

¹ Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu), UMR MA 102-AgroParisTech, Université Paris-Est, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France

² Department of Biological Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061-0406, USA

Monitoring pathogens whose natural habitat is the environment, requires careful consideration of a variety of questions regarding the target organisms (species, sub-species or ecotypes), the detection level required and the methods to be employed (culture vs. molecular techniques). These questions, and others, are particularly crucial for monitoring *Mycobacterium avium*, an environmental opportunistic pathogen of humans, animals, and poultry. Herein is a discussion of challenges for *M. avium* detection and enumeration and guidance for the adaptation of clinical methods to environmental samples.

Keywords *Mycobacterium avium*; detection; enumeration; culture; PCR; environment; water; soil

Introduction

If the environment is a proven source for an infectious disease, it is necessary to develop monitoring protocols for these pathogens to perform risk analysis and estimate the impact of the environmental pathogens on humans and other susceptible hosts. For instance *Mycobacterium avium* is a species belonging to the non-tuberculous mycobacteria (NTM), and an environmental opportunistic pathogen that can be found in various terrestrial and aquatic habitats [1], including drinking water distribution systems and household plumbing [2]. *M. avium* detection techniques were mostly developed for clinical samples and often did not require abundance measurements [3-8]. Development of techniques for *M. avium* monitoring has required substantial modification of existing clinical microbiological techniques, because the patient microbial flora represents a reduced and selected population pool compared to natural and human-engineered environments [9]. Natural habitats for *M. avium* are highly heterogeneous and carry a high diversity of microbial species [10, 11] which may interfere with the detection of NTM. As a consequence, detecting and measuring *M. avium* in environmental samples requires modification of classical clinical laboratory protocols in order to study its distribution and ecology and to carry out risk analysis [12]. Such studies require quantitative results of temporal and spatial distribution in the different compartments of ecosystems [13]. For instance, the extremely high surface hydrophobicity of *M. avium* leads to its preferential attachment to surfaces. As a consequence, *M. avium* in drinking water distribution systems and households is growing on pipe surfaces and only present in low numbers in the bulk water [14]. Moreover, environmental populations of *M. avium* are highly diverse and may constitute genetic reservoirs for virulent genotypes which have been yet identified [15-17]. As a result, targeting only the population density (e.g. *M. avium* density) may not be a sufficient indicator for risk analysis.

1. Objectives

The monitoring of environmental pathogens requires three invariable elements: (1) a specific and sensitive detection tool in order to avoid false-positive and false-negative results, (2) a quantitative tool in order to determine the main natural sources, and (3) a typing tool in order to track them from environment to susceptible hosts. Traditionally *M. avium* has been detected in clinical and environmental samples using culture-based techniques; however these techniques may not be well suited for environmental samples. As *M. avium* is relatively slow growing compared to other microorganisms, decontamination of samples from patient or environmental samples have been successfully developed for *M. avium* cultivation and enumeration [7, 8, 18, 19]. However, some of these decontamination procedures are insufficient for environmental samples as non-target species may be resistant to decontamination and outcompete *M. avium* on non selective media [12]. Also, decontamination results in loss of mycobacteria [6-8]. Methods based on the polymerase chain reaction (PCR) were also developed for clinical samples. Although these molecular techniques provide rapid results and permit detection of unculturable cells [20], they are currently limited in that epidemiological tracing cannot be performed. Molecular techniques (e.g., PCR) that were developed for clinical samples may also not be adapted to environmental samples. Several biases may arise from the presence of interfering agents such as organic matter and microorganisms leading to false-negative or -positive results. For example, polysaccharides and humic and fulvic acids interfere with PCR, thus requiring their removal from samples before DNA amplification [21-23]. As the spectrum of microorganisms may be wider and more diverse in environmental than in patient samples, PCR primers for species-, subspecies-, or type-specific amplification reactions should be highly

specific. Our goal is to propose a guideline (in the form of a decision tree) to help selecting and developing appropriate tools (culture and non-culture methods) for *M. avium* monitoring in surface water, treatment plant, water distribution system, and in the household.

2. General considerations

Depending on the physiological, epidemiological and ecological characteristics of the waterborne microorganisms for which environmental monitoring studies must be conducted, several analytical points must be taken into account before development of new analytical methods or before application of previously described methods. Table 1 lists these considerations, which may be unique to the studied waterborne microorganism, and which integrate analytical points related to the study as the expected outcome, the favored method, the identification level or the investment and analytical points related to the nature of the studied matrix, the presence of potential inhibitors or the size of the samples.

Table 1: List of general considerations for environmental waterborne microorganism monitoring

Analytical points	Questions	Answers
Relative to the study	Outcome	Detection or enumeration
	Method	Cultivation or non-cultivation
	Identification level	Genus, species, subspecies or type
	Investment	Time, cost
Relative to the sample	Studied matrix	Suspension, biofilm, soil
	Sample size	Volume, concentration
	Interference	Competitors, inhibitors, pH, salinity

2.1 Analytical points related to the study

Concerning *M. avium* monitoring, studies have demonstrated that it is present in a variety of aquatic environments such as surface water [9, 24-26], water distribution systems [27], hospital plumbing [28], spas and hot tubs [29], nail salons [30], and household plumbing [31]. Consequently, measurement of *M. avium* densities is necessary to rank these potential sources on the basis of risk. Specifically for *M. avium* and other slowly growing pathogenic mycobacteria, non-cultural methods represent an alternative to avoid long cultivation times, especially molecular methods which could type at the subspecies level members of *M. avium* in complex matrix. As the *M. avium* complex consists of four subspecies, *avium*, *hominissuis*, *silvaticum*, and *paratuberculosis*, each with a unique ecology and epidemiology, and genetic variability [15-17], identification of major sources of each requires a quantitative tool which could be able to distinguish subspecies and type each isolate. Knowledge of the ecological niche of *M. avium* and its subspecies may be useful to determine optimal growth conditions and thus improve culture methods. The presence of *M. avium* in surface water is correlated with low pH level, presence of humic and fulvic acids, microaerobic conditions [32]. For example, coastal southeastern United States swamps and peatlands and boreal forest soils of northern Europe and North America yield high numbers of *M. avium* [2, 33]. Quite possibly, inclusion of humic and fulvic acids addition to culture media could stimulate and increase *M. avium* growth [34] and shorten the time of detection by culture methods. Knowledge of *M. avium* ecology could also assist in direction of the sampling strategy. For instance monitoring *M. avium* in watersheds should give priority to waters and soils of low pH and high humic and fulvic acid content. Moreover, the hydrophobicity NTM cell wall, favor their attachment to interfaces (water/solid surface or water/air) and hydrophobic compounds uptake (such as oil, polycyclic aromatic hydrocarbons). As a consequence it seems preferable to track *M. avium* in biofilms of water distribution systems and neuston of surface water, than in bulk water. Indeed, *M. avium* is able to form biofilms in water distribution system, particularly *M. avium* subsp. *hominissuis* [35] in the presence of Ca^{2+} , Mg^{2+} or Zn^{2+} ions and glucose or peptone as a carbon source [36]. *M. avium* biofilms in drinking water distribution systems also protect cells from chlorine exposure [37, 38].

2.2 Analytical points related to the sample

Primary consideration must be placed on estimates of required water sample volumes and whether a concentration step is required for detection and enumeration. For *M. avium* monitoring by either culture or molecular techniques, water sample volumes can range between 50 ml and 1000 ml, and water can be concentrated by centrifugation or filtration [29, 32, 39-46]. The method and sampling volume will differ according to the anticipated number of *M. avium* cells, to the turbidity of the sample that may limit the filtration step, and also to the quantity of non-targeted microorganisms or PCR inhibitors which may interfere with NTM detection using cultural methods or non-cultural methods, respectively. For example, *M. avium* cultivation from spas (hot tubs) [29] or footbaths [30] involved collection using swab samples in biofilms [30] or centrifugation of high water volumes (400 ml) [29]. PCR-based detection of *M. avium*

subspecies *paratuberculosis* (MAP) was conducted using centrifugation or tangential-flow-filtration of high sample volume from untreated water (1 liter) and from sewage treatment effluent (10 liter), or very high volume (100 liter) from surface water [24-26], because of the variability of numbers of MAP in each type of sample. As emphasized above, the sampling volume of molecular methods is also conditioned by the DNA extraction method to remove PCR inhibitors [47, 48]. The presence of suspended matter may also determine the choice of the concentration method, as a filter may rapidly be obstructed by particles [12]. In addition, it is known that *Mycobacterium* species are present outside but also inside the soil aggregates [49]. Consequently, isolation of mycobacteria from soil requires the use of pre-treatment of the sample, which could be homogenized using for example a blender or sonicator [49] before DNA extraction or decontamination procedures. Most of the time, as *M. avium* isolation, NTM isolation from water is performed using concentration procedure prior the decontamination procedure [12, 29, 32, 44-46], and seldom posterior [43]. Consequently, a future harmonization of sampling volume and concentration method is necessary in order to be able to compare results of different studies. The choice and improvement of detection methods should also take in consideration the presence of potential competitors and inhibitors in the sample.

3. Testing methods

3.1 Recovery rate of the targeted microorganism or its DNA

Both culture and molecular methods are dependent upon high percent recovery of the target. In fact, sampling volume is conditioned by the recovery rate of the targeted organisms, which is closely related to efficiency of the applied method. Because it is not yet possible to know with certainty the number of any pathogen in an environmental samples [12], recovery rate of both culture and molecular methods cannot be evaluated directly. However, parallel studies of *M. avium* isolation methods using different methods does allow identification of superior methods based on either number of *M. avium* or spectrum of types. Further, isolation methods from water or soil samples can be compared by measurement of the number of non-target contaminants [39, 40]. For *M. avium* and other mycobacteria, reducing the number of competitors, able to outgrow and cover mycobacterial colonies, is important. One way around this dilemma is to inoculate environmental samples in order to compare the efficiencies of isolation methods. One can measure the survival frequency of target and contaminant cells exposed to chemical disinfectants [41], measure the isolation frequency of target and non-target microorganisms [50], or independently measure recovery of target and interfering microorganisms [12] after artificial inoculation of the sample.

3.2 Models based on spiking and growing

When assessing the recovery of a particular pathogen using either a culture- or molecular-based methods for detection, isolation or enumeration by spiking a sample, an important consideration is the physiological state of the added microbial cells. Concerning *M. avium* detection, isolation, or enumeration, the spiking procedure is usually performed with a reference strain which is cultivated in nutrient-rich laboratory medium before being added into the sample [12, 41, 50]. Firstly, even if several reference strains are used, it can never be representative of all *M. avium* subspecies or types or mycobacteria [1]. Secondly, the physiologic state of target or non-target microorganisms from nutrient-rich laboratory-media into environmental samples is considerably different from the state of those targets in environment. The targeted NTM from environment are likely more resistant toward isolation procedures (that include disinfectants or antibiotics), than the spiked reference strain cells, and only a substantial part of the microbial community of environment is constituted of viable but nonculturable (VBNC) microorganism [51]. Thirdly, without knowing the recovery rate of the isolation methods, targeted microorganisms are often spiked into the sample using high level of cells in order to be able to compare methods to each other, which does not reflect the low numbers of environmental harmful microorganisms.

4. Adaptation of clinical laboratory techniques to environmental monitoring

The different problems which must be resolved in order to adapt cultural or molecular clinical laboratory techniques, to environmental monitoring of pathogenic microorganisms are listed in Table 2.

Table 2: List of the problems for adapting clinical laboratory techniques according to the method type

Method	Adaptation problems
Cultivation	<ul style="list-style-type: none"> - Selectivity of the media used to isolated microorganisms from clinical samples is not adapted to the environmental samples, which contain a wider diversity of microorganisms. - Efficiencies of decontamination procedures used to isolate microorganisms in clinical samples are low for the treatment of environmental samples, which contain higher densities and diversity of resistant non-target microorganisms.
Non-cultivation	<ul style="list-style-type: none"> - Specificity and sensitivity towards targets of clinical methods are not adapted to the environmental samples, because they are checked, most of the time, using microorganisms only isolated from human cases. - DNA extraction protocols, which were developed to treat medical samples, do not take into account of the environmental PCR inhibitors.

4.1 Case Study: Adaptation of cultural techniques for *M. avium*

The mycobacterial growth media [39-41], as Löwenstein-Jensen (LJ), Ogawa egg yolk medium (OEY), Ogawa medium ofloxacin ethambutol (OEOE) and Middlebrook medium (7H10 or 7H11), were developed for the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical samples. The media composition is directed by the nutritional requirements of *M. tuberculosis*, not other mycobacteria. As a consequence, those standard mycobacterial media do not provide optimal growth of mycobacteria that are not members of the *M. tuberculosis* group. Further, some of the constituents are there to neutralize the decontaminants used to process sputum; for example oxalic acid and cetylpyridinium chloride to kill other bacteria and mucolytic agents to break up sputum. However the decontaminating agents used to process sputum are inadequate for decontamination of environmental samples due, in part, to the great diversity of microorganisms in environmental samples [10, 11]. Removal of interfering microorganisms is a critical point of *M. avium* isolation from environmental samples because the target concentration level is very low. Consequently, selective *M. avium* isolation methods (i.e. ability to isolate the targeted microorganism avoiding interfering microorganism growth) must be improved, for example by antibiotics supplementation in the media [12, 52, 53]. But it is important to be careful with the choice of antibiotics, because certain can be harmful for the target [12]. Moreover, selectivity of the media could be improved optimizing pH, nutrient concentration, CO₂ and oxygen level that will be more adapted to *M. avium* growth. Using media which contain low concentrations of nutrients (including the carbon source) and using extracellular factors such as resuscitation promoting factor (Rpf), may be a good strategy for resuscitation of nonculturable dormant cells and thus improve the cultivation of mycobacteria from environmental samples [54].

4.2 Case Study: Adaptation of non-cultural techniques for *M. avium*

The specificity (i.e. the proportion of true negatives that are correctly identified by the test) is measured using strain collections of non-target microorganisms (negative control) [55-58]. The sensitivity (i.e. the proportion of true positives that are correctly identified by the test) of molecular methods is tested using populations of target microorganisms (positive control) [55-58]. Consequently, specificity and sensitivity (as defined above) of a molecular method originally developed for clinical samples must be checked before application to environmental samples. More precisely, as the spectrum of environmental microorganisms may be different than that found in clinical samples, measurements of specificity and sensitivity should include environmental strains and not only clinical strains. Moreover, the specificity and sensitivity of molecular methods should not be evaluated only using *in silico* analysis, but should always be confirmed *in vitro* using target and non-target strains [5, 33, 59-61]. Sensitivity, as defined above for diagnostic tests, should not be confused with the limit of detection (LOD) of a particular molecular method. Contrary to environmental samples whose volume can be modulated, the LOD of non-cultural methods applied to clinical samples must be taken into account. But, as clinical samples, the yield of DNA extraction from environmental samples must be high enough in order to avoid false-negative results. Moreover, as emphasized previously, DNA extraction method must be able to remove PCR inhibitors from environmental samples. Although different DNA extraction procedures have been developed for detection or enumeration of *M. avium* [47, 62] or other microorganisms from environmental samples [63, 64], their effectiveness in removal of PCR inhibitors have not been assessed against a wide variety of sample types [47, 62-64]. Concerning the LOD, colony counts are used as the reference or "gold standard" for determining the limit of detection of non-cultural methods for detection or enumeration. That reference is based on the assumption that every viable cell in a population can form a colony. However, that is not necessarily the case; witness the number of reports of VBNC microorganisms [20, 51, 65]. Further, as culture conditions for a substantial proportion of microorganisms in a population have not been identified, it would follow that molecular methods would be superior as potentially all microorganisms could be detected, identified, and enumerated.

5. Culture or non-culture methods?

Tables 3 and 4 sum the advantages and disadvantages of cultural and non-cultural methods. These tables could serve as a guide for selecting a method for monitoring an environmental pathogen.

5.1 Culture methods

As shows in Table 1, the main advantage of cultural methods resides in their low cost and the ability to extend the investigation to including identification, physiology profiling, or genetic analyses. For *M. avium*, identification can be performed by cultural and biochemical analysis [66], analysis of mycobacterial (mycolic acids by high performance liquid chromatography (HPLC) [67-78], or multilocus sequencing analysis (MLSA) of genes such as *rrs*, *gyrA*, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB*, *sodA* or the 16S-23S internal transcribed spacer [79, 80]. Isolation of *M. avium* colonies allows analysis of such physiologic characteristics as growth requirements (e.g., auxotrophy, iron) and growth conditions (e.g., response of growth to different oxygen concentrations) [81]. Genetic analysis has led to knowledge of NTM complete genomes (e.g. *M. abscessus*, *M. avium*, *M. gilvum*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans*, *M. vanbaalenii*) [82-84]. In order to carry out molecular epidemiology studies and library-dependant source tracking, several clinical and environmental NTM isolates can be now fingerprinted. Indeed, the typing methods of NTM strains were recently reviewed [85]. Today, *M. avium* and other slow growing NTM such as *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. haemophilum* and *M. ulcerans*, and rapid growing mycobacteria as *M. fortuitum*, *M. abscessus* and *M. chelonae* can be characterized using serotyping, biotyping, multi-locus enzyme electrophoresis (MLEE), plasmid profiling, repetitive sequence typing (*rep*-PCR), arbitrary primed PCR (AP-PCR), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and insertion sequence restriction fragment length polymorphism (IS-RFLP) [85].

Nevertheless, as shown in Table 3, the choice of cultural methods poses several problems. Although the media and the culture conditions of *M. avium* appear to generally involve either primary plating on either Löwenstein-Jensen or Middlebrook agar media, not all *M. avium* colonies can be detected. Principally, the virulent transparent colony types are almost invisible on Löwenstein-Jensen medium. Although a temperature of 30°C can be used for growth, that is below the optimal temperature of growth for most mycobacterial species, including *M. avium*. However, higher temperatures exclude recovery of a number of pathogens; for example, *Mycobacterium haemophilum*, and *Mycobacterium marinum*.

Table 3: Advantages and disadvantages of cultivation methods

Advantages	Disadvantages
Identification	Choice of media
Physiological analysis	Choice of culture conditions
Genetic analysis	Growth of interfering microorganisms
Fingerprinting	Fast growing organisms are favored
Inexpensive, no special equipment required	Time consuming
	Bias of viable but non cultivable targets

5.2 Non-cultural methods

As in other fields of the microbiology, advances in molecular biology for 20 years have increased considerably the knowledge of mycobacteriology [86]. As shown in Table 4, non-cultural methods are of great interest because these high throughput methods allow to detection of unculturable microorganisms and are less time-consuming, particularly for NTM which grow very slowly. Moreover, contrary to the cultural methods, the non-cultural methods are able to detect specifically a target without other complementary investigations as identification, which saves also a considerable amount of time. The majority of mycobacterial detection methods are based on PCR [57, 59], PCR and probe hydrolysis [5], sandwich hybridization [61], real-time PCR [58, 60], PCR and dot blot [55, 56] and target the 16S rRNA gene [5, 55, 56, 59-61] or genes such as *rpoB* [57] or *hsp65* [58]. Recently, some studies describe methods to detect and fingerprint mycobacterial assemblages using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and targeting the 16S rRNA gene [33, 87-91]. Nevertheless, no study has managed to compare specificity, sensitivity, and limit of detection of these methods which target different genes and also different loci in these genes.

A clear advantage of non-culture methods is their ability to detect VBNC. Unfortunately, non-cultural methods can amplify extracellular DNA and do not differentiate viable microorganisms from non-viable microorganisms. Indeed, DNA persists a relatively long time after cell death, and consequently molecular methods have been developed to detect viable cells by amplifying mRNA using reverse transcriptase PCR (RT-PCR or RT-qPCR). However, RT-PCR methods are difficult to implement due to the instability of RNA [92].

Recently, ethidium monoazide bromide (EMA) was proposed in order to differentiate viable of non-viable cells in environmental samples from wastewater treatment samples. EMA is a DNA/RNA intercalating dye that enters in cells with damaged membranes and covalently binds to DNA upon photoactivation which avoid other molecular applications as PCR [93]. This approach is of growing interest, but optimum conditions must still be determined for each sample

due to sample matrix effects [20]. Moreover, and this analytical bias is seldom taken into account, PCR reactions can also be inhibited by high DNA concentrations. Indeed, as in clinical samples, reactions for molecular detection or enumeration developed for environmental samples, require dilution of the samples if the total extracted DNA inhibits the PCR reaction. Such cases decrease the detectable quantities of the targets, and can lead to fault negative results.

If a NTM quantitative method is based on 16S rRNA analysis, a bias can occur due to the copy number of 16S rRNA operons [5, 55, 56, 59-61]. With the exception of the rapidly growing species *M. chelonae*, *M. abscessus* and *M. alvei* which contain one copy of 16S rRNA [82, 94], and the slowly growing species *M. terrae* and *M. celatum* which contain two copies of 16S rRNA [95, 96], the other rapid and slow growing mycobacteria (including *M. avium*), already studied, contain generally two and one copy of 16S rRNA, respectively. Consequently, the use of a mycobacterial strain DNA containing one 16S rRNA copy as standard, could overvalue a sample constituted of fast growing NTM containing two 16S rRNA copies, and in reverse, the use of strain DNA containing two 16S rRNA copies, could undervalue a sample mainly constituted of slow growing cells containing one 16S rRNA copy. The same problem occurs when the insertion sequences are used for measurement. For example, insertion sequence IS900, which is considered specific for MAP [24, 25] has 17 repeats in the reference genome of MAP strain K10 [83]. However, the copy number ranges between 14-20 times in other MAP strains [97, 98]. Consequently, real-time qPCR methods targeting the insertion sequence IS900 can be used to detect MAP [62], but not to enumerate these subspecies [97].

Table 4: Advantages and disadvantages of non-cultivation methods

Advantages	Disadvantages
Rapid	Inhibition of amplification by PCR inhibitors
High throughput methods (many samples can be analyzed simultaneously)	Inhibition of amplification by high DNA concentration
Specifically identification of the targets without any other investigations	Bias of quantitative methods based on genes with variable number of copies
No bias of viable but non cultivable targets	Bias of non-viable targets and extracellular DNA
	Bias due to differential efficiency among species of DNA extraction and PCR amplification
	Expensive chemicals and equipment

6. Mycobacteria monitoring guideline

The possibilities for *M. avium* monitoring in environmental water are summed up in Figure 1. We do not propose an ideal method, but a tool box containing several methods which can be used in combination depending upon the objective of the exercise and the anticipated problems. Indeed, "what is our purpose?" is the first question which must be asked. This question will condition the choice of the analytical tools that can be used independently or in combination. Currently, as *M. avium* typing and source tracking still requires the isolation of strains, non-cultural typing methods must also be developed. Developments of cultural and non-cultural methods must be checked *in vitro* and not only *in silico*, and must take into account of sensitivity (i.e. ability to not detect the non-targeted microorganisms) and specificity (i.e. ability to detect all type of targeted microorganisms), using strain collections isolated from the studied matrix, and avoiding targets whose copy number is variable. Concerning cultural methods applied to environmental samples, quantitative tools could be developed using new inhibitors of interfering microorganisms and stimulating NTM growth based on better knowledge of their physiology and ecology. Typing methods of the isolated NTM could be developed for NTM species which cannot be currently characterized [85]. This decision tree of the adequate analytical strategy can be applied to environmental monitoring of other waterborne pathogens, but also to monitor NTM that can be useful for bioremediation and biotechnology purpose. For instance NTM species (not pathogenic and also pathogenic ones) are known to degrade recalcitrant organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and other xenobiotic molecules [99-107]. The methods developed for pathogenic NTM monitoring in environment could be used for PAH degrader mining and monitoring in polluted environment or in bioreactors.

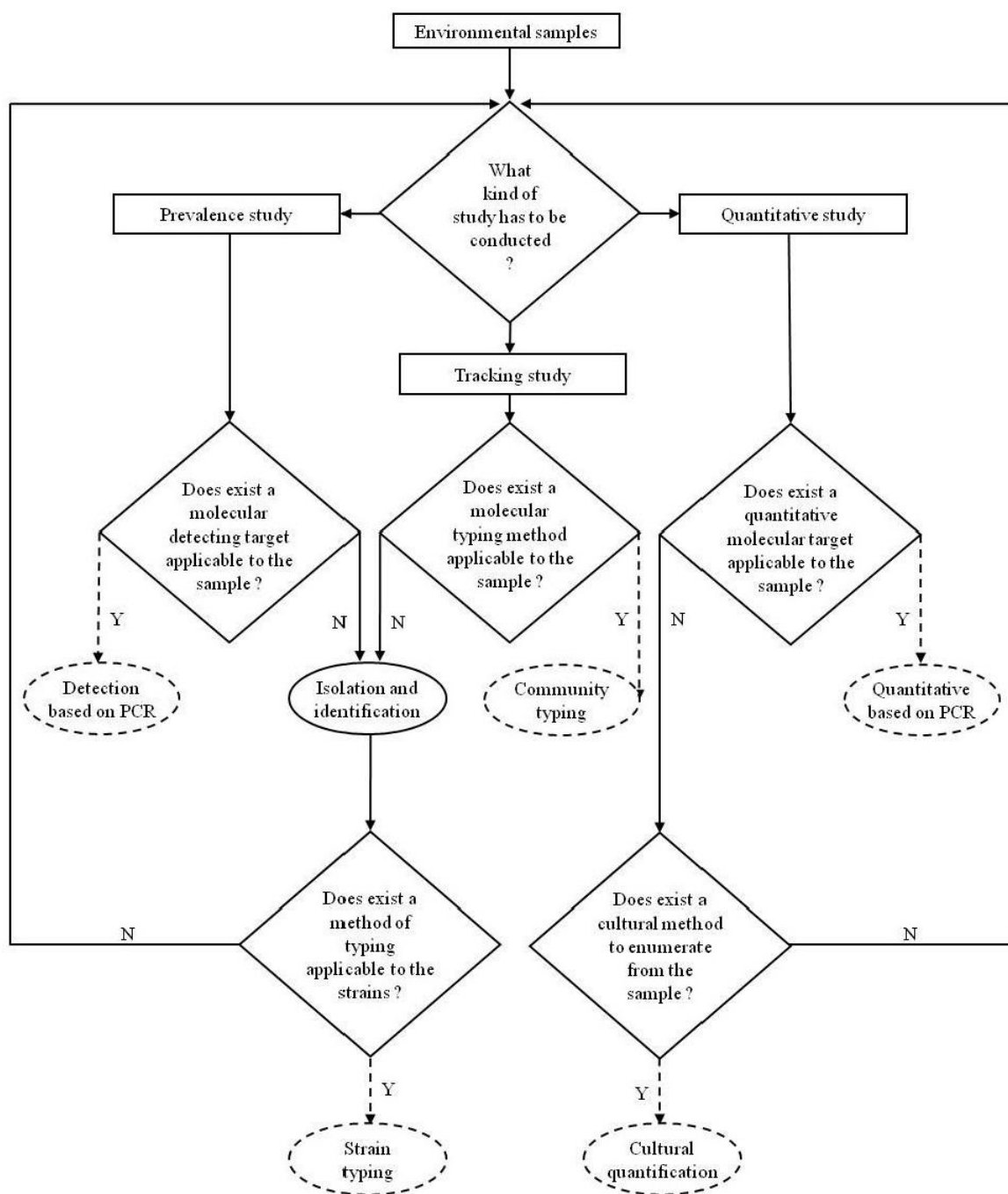


Fig. 1 Decision tree showing current possibilities (full lines) and future challenges (dotted lines) for environmental waterborne mycobacteria monitoring. Rectangles, circles and rhombuses correspond to the goals, to the questions which must be answered, and to the actions which must be conducted, respectively. PCR corresponds to polymerase chain reaction.

Acknowledgements The support by Paris-Est University and Virginia Polytechnic Institute and States University are gratefully acknowledged.

References

[1] Kazda J. The chronology of mycobacteria and the development of mycobacterial ecology. In: Kazda J, et al., eds. *The ecology of Mycobacteria: Impact on animal's and human's health*. Dordrecht Heidelberg London New York, Springer; 2009:1-11.

- [2] Falkinham JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;107:356-367.
- [3] Brunello F, Favari F, and Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Various Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37:1206-1209.
- [4] Buijtel PCAM and Petit PLC. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Microbiological Methods*. 2005;62:83-88.
- [5] Garcia-Quintanilla A, Gonzalez-Martin J, Tundo G, Espasa M, and Jiménez de Anta MT. Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40:4646-4651.
- [6] Kubica GP, Kaufmann AJ, and Dye WE. Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *American Review of Respiratory Diseases* 1964;87:775-779.
- [7] Petroff SA. A new and rapid method for the isolation and cultivation of the tubercle bacillus directly from sputum and feces. *Journal of Experimental Medicine*. 1915;XXI:38.
- [8] Tacquet A and Tison F. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1961;100:676-680.
- [9] Bland CS, Ireland JM, Lozano E, Alvarez ME, and Primm TP. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:5719-5727.
- [10] Kenzaka T, Yamaguchi N, Tani K, and Nasu M. rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology*. 1998;144:2085-2093.
- [11] Winter C, Hein T, Kavka G, Mach RL, and Farnleitner AH. Longitudinal Changes in the Bacterial Community Composition of the Danube River: a Whole-River Approach. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;79:421-431.
- [12] Radomski N, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Moilleron R, and Lucas FS. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76:3514-3520.
- [13] Garcia-Armisen T and Servais P. Respective contributions of point and non-point sources of *E. coli* and enterococci in a large urbanized watershed (the Seine river, France). *Journal of Environmental Management*. 2007;82:512-518.
- [14] Falkinham JO, Norton CD, and LeChevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67:1225-1231.
- [15] Mijs W, de Haas P, Rossau R, van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, and van Soolingen D. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:1505-1518.
- [16] Radomski N, Thibault VC, Karoui C, de Cruz K, Cochard T, Gutiérrez C, Supply P, Biet F, and Boschirol ML. Genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins, studied by MIRU-VNTR and IS1311 RFLP typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48:1026-1034.
- [17] Thorel MF, Krichevsky M, and Lévy-Frébault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1990;40:254-260.
- [18] Kubica GP, Baess I, Gordon RE, Jenkins PA, Kwapinski JB, McDermont C, Pattyn SR, Saito H, Silcox V, Stanford JL, Takeya K, and Tsukamura M. A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. *Journal of General Microbiology*. 1972;73:55-70.
- [19] Soulier Majidi M, Ciupek C, Malbrunot C, and Baufine Ducrocq H. Etude comparative du système BACTEC 9000 MB et du milieu de Lowenstein Jensen pour la culture des mycobactéries. *Pathologie-biologie*. 2001;49:799-807.
- [20] Gedalanga PB and Olson BH. Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;82:587-596.
- [21] Lloyd KG, MacGregor BJ, and Teske A. Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009:1-9.
- [22] Robeson MS, Costello EK, Freeman KR, Whiting J, Adams B, Martin AP, and Schmidt SK. Environmental DNA sequencing primers for eutardigrades and bdelloid rotifers. *BMC Ecology*. 2009;9:1-10.
- [23] Sagova-Mareckova M, Cermak L, Novotna J, Plhackova K, Forstova J, and Kopecky J. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74:2902-2907.
- [24] Pickup RW, Rhodes G, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Bull TJ, Weightman A, Hurley M, and Hermon-Taylor J. *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;71:2130-2139.
- [25] Pickup RW, Rhodes G, Bull J, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Hurley M, and Hermon-Taylor J. *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;72:4067-4077.
- [26] Whan L, Ball HJ, Grant IR, and Rowe MT. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:7107-7112.
- [27] Vaerewijck MJM, Huys G, Palomino JC, Swings J, and Portaels F. Mycobacteria in drinking water distribution systems; ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005;29:911-934.
- [28] Primm T, Lucero CA, and Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17:98-106.

- [29] Lumb R, Stapledon R, Scroop A, Bond P, Cunliffe D, Goodwin A, Doyle R, and Bastian I. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70:4906-4910.
- [30] Vugia DJ, Jang Y, Zizek C, Ely J, Winthrop KL, and Desmond E. Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11:616-618.
- [31] Marras TK, Wallace RJ, Koth LL, Stulbarg MS, Cowl CT, and Daley CL. Hypersensitivity pneumonitis reaction to *Mycobacterium avium* in household water. *Chest*. 2005;127:664-671.
- [32] Iivanainen EK, Martikainen PJ, Vaananen PK, and Katila ML. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59:398-404.
- [33] Niva M, Hernesmaa A, Haahtela K, Salkinoja-Salonen M, Sivonen K, and Haukka K. Actinobacteria communities of boreal forest soil and lake water are rich in mycobacteria. *Boreal Environment Research*. 2006;11:45-53.
- [34] Kirschner RA, Parker BC, and Falkinham JO. Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiology Ecology*. 1999;30:327-332.
- [35] Johansen TB, Agdestein A, Olsen I, Nilsen SF, Holstad G, and Dønne B. Biofilm formation by *Mycobacterium avium* isolates originating from humans, swine and birds. *BMC Microbiology*. 2009;9:1-10.
- [36] Carter G, Wu M, Drummond DC, and Bermudez LE. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology*. 2003;52:747-752.
- [37] Steed KA and Falkinham JO. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72:4007-4011.
- [38] Lehtola MJ, Torvinen E, Kusnetsov J, Pitkänen T, Maunula L, von Bonsdorff CH, Martikainen PJ, Wilks SA, Keevil CW, and Miettinen IT. Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Caliciviruses* in Drinking Water-Associated Biofilms Grown under High-Shear Turbulent Flow. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73:2854-2859.
- [39] Neumann M, Schulze-Robbecke R, Hagenau C, and Behringer K. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63:547-552.
- [40] Kamala T, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P, and Prabhakar R. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994;60:1021-1024.
- [41] Carson LA, Cusick LB, Bland LA, and Favero MS. Efficacy of chemical dosing methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54:1756-1760.
- [42] Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SV, and Katoch VM. Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70:3751-3753.
- [43] Hilborn ED, Covert TC, Yakrus MA, Harris SI, Donnelly SF, Rice EW, Toney S, Bailey SA, and Stelma GN. Persistence of Nontuberculous Mycobacteria in a Drinking Water System after Addition of Filtration Treatment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72:5864-5869.
- [44] Torvinen E, Suomalainen S, Lehtola MJ, Miettinen IT, Zacheus O, Paulin L, Katila ML, and Martikainen PJ. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70:1973-1981.
- [45] Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E, Suutari M, Paulin L, Rudbäck E, Tortoli E, Vincent V, Mättä R, and Katila ML. Characterization of *Mycobacterium bohemicum* isolated from human, veterinary, and environmental sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39:207-211.
- [46] Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, and Vincent V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68:5318-5325.
- [47] Käser M, Ruf MT, Hauser J, Marsollier L, and Pluschke G. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75:414-418.
- [48] Queiroz APS, Santos FM, Sassaroli A, Harsi CM, Monezi TA, and Mehnert DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67:4614-4618.
- [49] Matsumoto A, Takahashi Y, Iwai Y, and Ômura S. Isolation of Gram-positive bacteria with high G+C from inside soil aggregates. *Actinomycetologica*. 2006;20:30-34.
- [50] Thomson R, Carter R, Gilpin C, Coulter C, and Hargreaves M. Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74:3094-3098.
- [51] Lleo MM, Bonato B, Tafí MC, Signoretto C, Pruzzo C, and Canepari P. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Letters in Applied Microbiology*. 2005;40:289-294.
- [52] Donaghy JA, Totton NL, and Rowe MT. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 2003;37:285-291.
- [53] Stephan R, Schumacher S, Tasara T, and Grant IR. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *Journal of Dairy Science*. 2007;90:3590-3595.
- [54] Shleeva MO, Salina EG, and Kaprelyants AS. Dormant forms of mycobacteria. *Microbiology*. 2010;79:1-12.
- [55] Böttlinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, and Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28:1751-1759.
- [56] Zolg JW and Philippi-Schulz S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32:2801-2812.
- [57] Kim BJ, Hong SK, Lee KH, Yun YJ, Kim EC, Park YG, Bai GH, and Kook YH. Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42:1308-1312.

- [58] Tobler NE, Pfunder M, Herzog K, Frey JE, and Altwegg M. Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-Microarray. *Journal of Microbiological Methods*. 2006;66:116-124.
- [59] Mendum TA, Chilima BZ, and Hirsch PR. The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;185:189-192.
- [60] Dutil S, Veillette M, Mériaux A, Lazure L, Barbeau J, and Duchaine C. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environmental Microbiology*. 2007;9:2836-2843.
- [61] Nieminen T, Pakarinen J, Tsitko I, Salkinoja-Salonen M, Breitenstein A, Ali-Vehmas T, and Neubauer P. 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *Journal of Microbiological Methods*. 2006;67:44-55.
- [62] Cook KL and Britt JS. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;69:154-160.
- [63] Jara C, Mateo E, Guillamón JM, Torija MJ, and Mas A. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;128:336-341.
- [64] Mitchell KR and Takacs-Vesbach CD. A comparison of methods for total community DNA preservation and extraction from various thermal environments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008;35:1139-1147.
- [65] Sharma R, Ranjan R, Kapardar RK, and Grover A. 'Unculturable' bacterial diversity: An untapped resource. *Current Science*. 2005;89:72-77.
- [66] Timpe A and Runyon EH. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1954;44:202-209.
- [67] Butler WR, Jost KC, and Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29:2468-2472.
- [68] Butler WR and Kilburn JO. High-performance liquid chromatography patterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28:2094-2098.
- [69] Butler WR, Thibert L, and Kilburn JO. Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30:2698-2704.
- [70] Cage GD. High-performance liquid chromatography patterns of *Mycobacterium goodii* mycolic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30:2402-2407.
- [71] Cage GD. Direct Identification of *Mycobacterium* Species in BACTEC 7H12B Medium by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32:521-524.
- [72] Duffey PS and Guthertz LS. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* chromatotypes defined by curvilinear gradient HPLC of mycolic acids. *FEMS Microbiology Letters*. 1992;95:27-36.
- [73] Duffey PS, Guthertz LS, and Evans GC. Improved rapid detection of mycobacteria by combining solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34:1939-1943.
- [74] Guthertz LS, Lim SD, Jang Y, and Duffey PS. Curvilinear-gradient high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31:1876-1881.
- [75] Raffi F, Butler WR, and Cerniglia CE. Differentiation of a rapidly growing, scotochromogenic, polycyclic-aromatic-hydrocarbon-metabolizing strain of *Mycobacterium* sp. from other known *Mycobacterium* species. *Archives of Microbiology*. 1992;157:512-520.
- [76] Ridderhof JC, Wallace RJ, Kilburn JO, Butler WR, Warren N, Wong ES, Tsukamura M, and Steele LC. Chronic tenosynovitis of the hand due to *Mycobacterium nonchromogenicum*: Use of high-performance liquid chromatography for identification of isolates. *Reviews of Infectious Diseases*. 1991;13:857-864.
- [77] Steck PA, Schwartz BA, Rosendahl MS, and Gray GR. Mycolic acids - a reinvestigation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1978;253:5625-5629.
- [78] Thibert L and Lapierre S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31:1759-1763.
- [79] Adékambi T and Drancourt M. 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;54:2095-2105.
- [80] Gomila M, Ramirez A, and Lalucat J. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73:3787-3797.
- [81] Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, and Niederweis M. Physiology of mycobacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 2009;55:81-184.
- [82] Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, Macheras E, Heym B, Herrmann JL, Daffé M, Brosch R, Risler J, and Gaillard JL. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One*. 2009;4:1-12.
- [83] Li L, Bannantine J, Zhang Q, Amonsin A, May B, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, and Kapur V. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 2005;102:12344-13349.
- [84] Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PDR, Abdellah Z, Arrowsmith C, Chillingworth T, Churcher C, Clarke K, Cronin A, Davis P, Goodhead I, Holroyd N, Jagels K, Lord A, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Quail MA, Rabinowitsch E, Walker D, White B, Whitehead S, Small PLC, Brosch R, Ramakrishnan L, Fischbach MA, Parkhill J, and Cole ST. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research*. 2010;18:729-741.
- [85] Behr MA and Falkinham JO. Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiology*. 2009;4:1009-1020.

- [86] Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endodontic Topics*. 2004;9:5-14.
- [87] Pryor M, Springthorpe S, Riffard S, Brooks T, Huo Y, Davis G, and Sattar SA. Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Science & Technology*. 2004;50:83-90.
- [88] Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Wattiau P, Top EM, Verstraete W, and Springael D. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*. 2005;51:375-388.
- [89] Uyttebroek M, Vermeir S, Wattiau P, Ryngaert A, and Springael D. Characterization of cultures enriched from acidic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at Low pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73:3159-3164.
- [90] Uyttebroek M, Breugelmans P, Janssen M, Wattiau P, Joffe B, Karlson U, Ortega-Calvo JJ, Bastiaens L, Ryngaert A, Hausner M, and Springael D. *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. *Environmental Microbiology*. 2006;8:836-847.
- [91] Uyttebroek M, Spoden A, Ortega-Calvo JJ, Wouters K, Wattiau P, Bastiaens L, and Springael D. Differential responses of *Eubacterial*, *Mycobacterium*, and *Sphingomonas* communities in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. *Journal of Environmental Quality*. 2007;36:1403-1411.
- [92] Sheridan GEC, Masters CI, Shallcross JA, and Mackey BM. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64:1313-1318.
- [93] Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, and Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques*. 2003;34:804-813.
- [94] Menendez MC, Garcia MJ, Navarro MC, Gonzalez-y-Merchand JA, Rivera-Gutierrez S, Garcia-Sanchez L, and Cox A. Characterization of an rRNA Operon (*rrnB*) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species: Implications for the classification of mycobacteria. *Journal of Bacteriology*. 2002;184:1078-1088.
- [95] Ninet B, Monod M, Emler S, Pawlowski J, Metral C, Rohner P, Auckenthaler R, and Hirschel B. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34:2531-2536.
- [96] Reischl U, Feldmann K, Naumann L, Gaugler BJ, Ninet B, Hirschel B, and Emler S. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36:1761-1764.
- [97] O'Mahony J and Colin H. A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal of Microbiological Methods*. 2002;51:283-293.
- [98] Doran T, Tizard M, Millar D, Ford J, Sumar N, Loughlin M, and Hermon-Taylor J. IS900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hed* gene. *Microbiology*. 1997;143:547-552.
- [99] Derz K, Klinner U, Schphan I, Stackebrandt E, and Kroppenstedt RM. *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;54:2313-2317.
- [100] Hennessee CT, Seo JS, Alvarez AM, and Li QX. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59:378-387.
- [101] Hornmisch D, Brost I, Kohring GW, Giffhorn F, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Färber P, and Holzapfel WH. *Mycobacterium fluoranthivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;27:653-660.
- [102] Khan AA, Kim SJ, Paine DD, and Cerniglia CE. Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:1997-2002.
- [103] Kleespies M, Kroppenstedt RM, Rainey FA, Webb LE, and Stackebrandt E. *Mycobacterium hodleri* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996;46:683-687.
- [104] Rockne KJ, Liang W, Young LY, and Taghon GL. Toxicity of density separation media to *Escherichia coli* and *Mycobacterium* strain PC01: implication for density-separation of soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003;43:185-189.
- [105] Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, Xue W, and Warshawsky D. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:13-19.
- [106] Shor L, Liang W, Rockne KJ, Young LY, Taghon G, and Kosson D. Intra-aggregate mass transport-limited bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to *Mycobacterium* strain PC01. *Environmental Science & Technology*. 2003;37:1545-1552.
- [107] Willumsen P, Karlson U, Stackebrandt E, and Kroppenstedt RM. *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51:1715-1722.

II.2 / Nouvelle stratégie d'identification *in silico* de séquences conservées exclusivement dans les génomes de *Mycobacterium* spp.

New strategy for *in silico* identification of exclusively conserved sequences in *Mycobacterium* spp. genomes

Nicolas Radomski^{1*}, Frédéric Veyrier², Emmanuelle Cambau³, Régis Moilleron¹,
Laurent Moulin⁴, Marcel A. Behr⁵,
Françoise S. Lucas¹

Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France¹; Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, FR 75015 Paris, France²; AP -HP, Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, Hôpital Saint Louis, FR 75475 Paris, France³; Eau de Paris, Direction Recherche et Développement Qualité de l'Eau (DRDQE), 33 avenue Jean Jaurès, FR 94200 Ivry sur Seine, France⁴; McGill University Health Centre, 1650 Cedar Avenue, Montreal H3G 1A4, QC Canada⁵

Since appearance of molecular biology, several studies proposed specific molecular targets based on knowledge of sequencing analysis of housekeeping genes, non-functional RNA, and structural ribosomal RNAs. Concerning *Mycobacterium* spp detection, this situation led to developments of targets presenting either a high specificity but a low sensitivity, or conversely a high specificity but a low specificity. Today, we have more and more access to whole sequenced genomes thanks to recent appearance on high speed sequencing based on pyrosequencing methods, and new softwares were developed in order to compare these whole genomes. Consequently, we have used these tools and proposed a new strategy for *in silico* comparison of genomes allowing selection of exclusively conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes, and design sensitive and specific molecular targets at the same time. Among the 3989 predicted proteins from *M. tuberculosis* H37Rv, only 11 proteins showed between 80% and 100% of similarity with *Mycobacterium* spp. genomes, and less than 50% of similarity with closely related genomes of *Corynebacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* genera. Based on DNA sequence alignments of this 11 potential targets, it was possible to design primers and probe in order to detect ATP synthase subunits C which seems exclusively conserved in *Mycobacterium* spp. genome. Our results showed that this new strategy of molecular target design might be applied on other genera.

Key words: Mycobacteria genomes; conserved proteins; molecular targets; *in silico* analysis

Mycobacterium genus is constituted of several pathogenic species, including species of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) responsible of tuberculosis (i.e. *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* and *M. pinnipedii*), *M. leprae* and *M. lepremurium* species responsible of leprosy, and nontuberculous mycobacteria (NTM), which are potentially pathogenic species causing mycobacteriosis (14). Nevertheless, detection of mycobacteria by bacteriological tools is difficult because other microorganisms overgrow NTM colonies (24), and identification based on metabolic criteria do not allow to properly identify mycobacterial species and sub-species. Consequently, molecular tools were developed using knowledge of *rrs*, *gyrA*, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB*, *sodA* genes and 16S-23S internal transcribed spacer (ITS), whose sequence polymorphism could be used in order to identify mycobacteria species by multilocus locus sequence analysis (1, 10), and proposed to target different loci of the 16S rRNA (2, 6, 8, 16, 19-21, 23, 31-33, 36), or housekeeping genes as *gyrB* (7), *rpoB* (15), and *hsp65* (30), in order to detect *Mycobacterium* genus. Nevertheless, a recent study comparing several primers used for mycobacterial detection or identification, emphasized that most of these primers present either a high specificity (i.e. the proportion of true negatives that are correctly identified by the test) but a low sensitivity (i.e. the proportion of true positives that are correctly identified by the test), or conversely a high specificity but a low specificity (25). Indeed, some of these detections tools based on PCR reactions do not allow to detect some mycobacterial species, and the other detect closely related genera (25) included in *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* (CNM) group (13).

*Correspondence: Nicolas Radomski, Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains (Leesu) UMR MA 102-AgroParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, FR 77455 Champs sur Marne, France ; email: nicolas.radomski@leesu.enpc.fr ; tel: +33(0)666665536 ; fax: +33(0)145171627

Consequently, new strategies must be developed in order to design *Mycobacterium* genus targets and achieve high levels of specificity and sensitivity. However, as new mycobacterial sequences are added into genetic databases, our knowledge of mycobacterial genomes is increasing and this may help to design new primers and probes that will be both specific and sensitive.

Recently genomes of several mycobacterial species have been completely sequenced. Since whole sequencing of the first mycobacteria in 1998 (4) by Sanger sequencing method (*M. tuberculosis* H37Rv), mycobacterial sequenced genome number has highly increased thanks to increase of sequencing capacity and appearance of high speed sequencing based on pyrosequencing method (22). Today, GenBank data base gives access to whole genomes of seven other strains of the MTC (*M. tuberculosis* and *M. bovis* species), two strains of *M. leprae*, and eleven species and subspecies of NTM (*M. abscessus*, *M. avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. gilvum*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. sp. JLS*, *M. sp. KMS*, *M. sp. MCS*, *M. ulcerans*, *M. vanbaalenii*) (17, 27, 28). Moreover, three whole genomes of other NTM species were sequenced and are currently assembled (*M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. parascrofulaceum*). This increasing number of completely sequenced mycobacterial genomes lead to the development of the MycoHit software, which allowed to compare proteins of different mycobacteria species, and which allowed to describe the horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *M. tuberculosis* (34). This software was originally developed to detect horizontal gene transfers and mutations among whole mycobacterial genomes (34). However, MycoHit should also be useful for developing new primers and probes for mycobacteria detection and quantification in environmental and clinical samples.

In this paper, we explored the usefulness of this new tool for describing sensitive and specific targets of *Mycobacterium* spp.. We compared *in silico* proteins of whole mycobacterial genomes with those of non mycobacterial genomes using the MycoHit software, in order to find conserved sequences among mycobacteria that will not be shared with non-mycobacterial species. This strategy should be promising for primers and probes development.

MATERIALS and METHODS

In silico comparison strategy. In order to detect *M. tuberculosis* genes, presenting homologue genes in the other mycobacterial genomes, and not presenting homologue genes in the non-mycobacteria genomes, we used the MycoHit software version 14.17 (<http://www.molepi.mcgill.ca>) and performed an alignment search with Stand Alone tblastn algorithm as previously described (34). Based on the 3989 predicted proteins from *M. tuberculosis* H37Rv, corresponding to the query sequences used in order to search for matches in the genomic DNA of other organisms (Fig. 1), a matrix of 107703 scores (3989 protein sequences blasted against 12 non mycobacterial genomes and 15 mycobacteria genomes) was obtained. As previously described (34) and according to NCBI procedures (35), expected value was set at e^{-10} . Following sequence comparisons, the MycoHit software allowed to sort scores according to similarity requests which were performed on the one hand toward mycobacterial genomes, and on the other toward non-mycobacterial genomes (Fig. 1). A protein list of the reference target, which can be downloaded from NCBI web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), allowed identification of the conserved mycobacterial proteins presenting no homology in non mycobacterial genomes (Fig. 1).

Mycobacterial genome database. In order to performed comparisons of mycobacterial genomes with *M. tuberculosis* H37Rv genome using MycoHit software, sequences were obtained at NCBI web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the accession numbers: *M. abscessus* ATCC 19977 (CU458896.1), *M. avium* 104 (CP000479.1), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K10 (AE016958.1), *M. bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 (BX248333.1), *M. gilvum* PYR-GCK (CP000656.1), *M. marinum* M (CP000854.1), *M. smegmatis* MC2 155 (CP000480.1), *M. sp.* JLS (CP000580.1), *M. sp.* KMS (CP000518.1), *M. sp.* MCS (CP000384.1), *M. tuberculosis* CDC1551 (AE000516.2), *M. tuberculosis* H37Ra (CP000611.1), *M. tuberculosis* H37Rv (AL123456.2), *M. tuberculosis* KZN 1435 (CP001658.1), *M. ulcerans* Agy99 (CP000325.1), and *M. vanbaalenii* PYR-1 (CP000511.1). In order to not lose data during genome comparisons performed by MycoHit software, we have chosen to ignore the genomes of *M. leprae* Br4923 (FM211192.1), *M. leprae* TN (AL450380.1), because number of their coding proteins is much lower compared to other mycobacterial species (e.g. 1604 coding proteins in *M. leprae* Br4923 or 1605 coding proteins in *M. leprae* TN, against 6716 coding proteins in *M. smegmatis* MC2 155) (4, 9, 17, 27, 28). In the same goal, genomes of *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 (AM408590.1) and *M. bovis* BCG Tokyo 172 (AP010918.1) were also not taken into account, because these vicinal genomes present mutations (18). Moreover, genomes of *M. intracellulare* ATCC 13950 (ABIN00000000), *M. kansasii* ATCC 12478 (ACBV00000000) and *M. parascrofulaceum* BAA-614 (ADNV00000000) were not used also during MycoHit proceeding, because their genomes were still not assembled at the moment we performed the first screening step of our analysis. Nevertheless, these genomes of *M. leprae*, *M. bovis* BCG, *M. intracellulare*, *M. kansasii* and *M. parascrofulaceum* were used during alignment of sequences from the more conserved proteins in mycobacterial genomes.

Non-mycobacterial genome database. We selected non-mycobacterial genomes of species from the CNM group using the following accession numbers: *C. aurimucosum* ATCC 700975 (CP001601.1), *C. diphtheriae* NCTC 13129 (BX248353.1), *C. efficiens* YS-314 (BA000035.2), *C. glutamicum* ATCC 13032 (BX927147.1), *C. jeikeium* K411 (NC_007164), *C. kroppenstedtii* DSM 44385 (CP001620.1), *C. wrealiticum* DSM 7109 (AM942444.1), *N. farcinica* IFM 10152 (AP006618.1), *Nocardioides* sp. JS614 (CP000509.1), *R. erythropolis* PR4 (AP008957.1), *R. jostii* RHAI (CP000431.1), and *R. opacus* B4 (AP011115.1).

Primer pairs and probes design. In order to check the homology of the selected mycobacterial sequences, the protein and DNA sequences of these selected proteins were aligned using the ClustalW multiple alignment of the BioEdit software 7.0.9.0 with 1000 bootstraps (12). Primer pairs and probes were design from the best fitted gene sequences (after protein screening and selection) by visual analysis and using the Beacon Designer software version 7.90 (Premier Biosoft International, Palo Alto, Calif.).

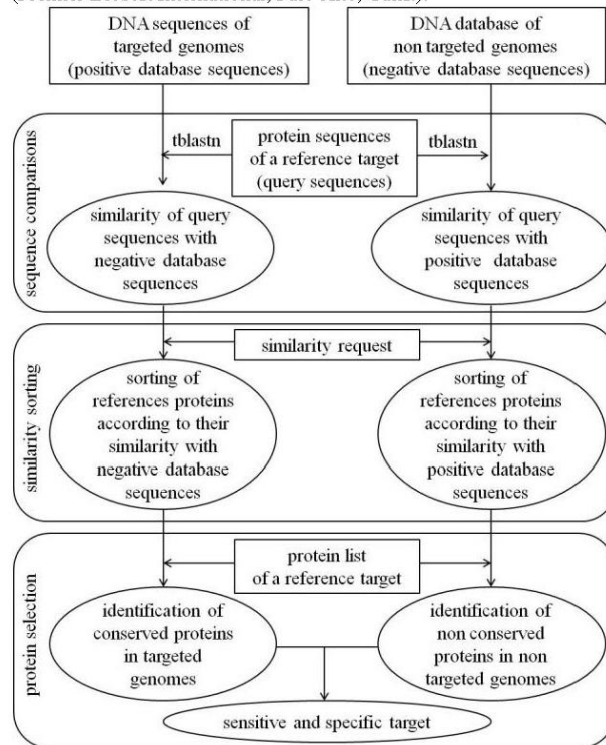


FIG. 1. Strategy used to identify sensitive and specific targets in *Mycobacterium* spp. whole genomes based on MycoHit software.

RESULTS and DISCUSSION

Mycobacterial genes commonly used for detection and/or identification. Without speaking of *rrs* gene and ITS which refer to a piece of non-functional RNA and to a structural ribosomal RNAs, our results showed that most of the genes commonly used for mycobacterial species identification, code for proteins which are conserved in mycobacterial genomes, but which present also similar conformations in non-mycobacterial genomes. Indeed, protein similarity levels of these genes, in comparison with *M. tuberculosis* H37Rv genome, were important for the other studied *Mycobacterium* spp. (96±2% for *gyrA*, 94±5% for *gyrB*, 79±5% for *groEL1* and 93±4% for *groEL2* corresponding to *hsp65*, 99±1% for *recA*, 96±2% for *rpoB*, 81±33% for *sodA*), and also for the studied non-mycobacterial microorganisms (86±5% for *gyrA*, 85±5% for *gyrB*, 89±3% for *groEL1* and 96±2% for *groEL2* corresponding to *hsp65*, 94±3% for *recA*, 88±4% for *rpoB*, 69±22% for *sodA*). Consequently, as previously described (1, 10), our results confirmed that *gyrA*, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB*, and *sodA* genes are appropriate in order to identify *Mycobacterium* spp., but emphasized also that their high similarities with non-mycobacterial genera, make specific target design delicate. These results are in accordance with the previous observations that the molecular targets which were designed based on *gyrB* (7), *rpoB* (15) or *hsp65* (30) genes, had low specificity (25). Prospection for most specific targets in mycobacterial genomes seems consequently necessary in order to improve current detection tools based on proteins and/or DNA.

RADOMSKI ET AL.

in silico strategy for specific target design

Selection of the exclusively conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes. Among the 3989 predicted proteins of *M. tuberculosis* H37Rv genome (Fig. 2a), about 54.6% (i.e. 2177 proteins) present protein similarities higher than 50% with the other studied mycobacterial genomes, and only 6.8% of these hypothetical conserved mycobacterial proteins (150 proteins) present similarities lower than 50% with the studied non-mycobacterial genomes. Consequently, almost half of *M. tuberculosis* H37Rv predicted proteins are potentially present in the genomes of CNM group members. Mycobacteria species belong to the Actinobacteria which may explain the presence of shared proteins with high G+C content non-mycobacterial species. Moreover, horizontal gene transfers from different bacteria widely present in soil or water, especially *Rhodococcus* sp., *Nocardia* sp. and *Streptomyces* sp. were previously considered to have happen in the *Mycobacteria* genus coming (9, 27, 34). Consequently, we choose to decrease the number of candidate proteins by restricting the panel of studied proteins to those exclusively conserved in mycobacterial genomes, focusing on *M. tuberculosis* H37Rv proteins with high similarity levels in comparison with other mycobacterial genomes, and a low similarity levels in comparison with non-mycobacterial genomes. To sum up, among the 3989 predicted proteins of *M. tuberculosis* H37Rv genome (Fig. 2a), we selected 11 proteins showing between 80% and 100% of similarity with *Mycobacterium* spp. genomes, and less than 50% of similarity with genomes of the other CNM group genera (Fig. 2b). Candidate proteins selected in *M. tuberculosis* H37Rv genome (Table 1), are the subunits C (locus Rv1305) and A (locus Rv1304) of the ATP synthase, the cyclopropane mycolic acid synthase (CMAS) coded by the *cmxA1* gene in *M. tuberculosis* H37Rv (locus Rv3392c), hypothetical PE or PPE family proteins (loci Rv0285 and Rv3022c), proteins coded by *esx* genes *esxG*, *esxH* and *esxR* in *M. tuberculosis* H37Rv (loci Rv0287, Rv0288, Rv3019c, respectively), and proteins such as a lipoprotein coding by *lppM* gene (locus Rv2172c), an oxidoreductase (locus Rv0197), and a small secreted protein (locus Rv0236A).

Checking of the homology of the conserved mycobacterial protein. Among the 11 selected mycobacterial proteins, protein alignments revealed that the ATP synthase subunits C (locus Rv1305), the oxidoreductase (locus Rv0197), and the small secreted protein (locus Rv0236A), are the less polymorphous among NTM species (Table 1 and Supplementary material 1) and thus seem very promising for primers and probes design. DNA sequence alignment of the oxidoreductase and of the small secreted protein did not allow design of PCR primers achieving a length of at least 18 oligonucleotides (data not shown). Only DNA sequence alignment of the ATP synthase subunits C allow to design PCR primer pair and a probe (Supplementary material 2). We designed the following forward and reverse primers and probe: forward primer 5'-CGGYGCCGGTATCGGYGA-3' (Tm=62°C), with or without the probe 5'-ACSGAGATGAAGAACGGBGTRAA-3' (Tm=68°C) which could be hydrolyzed by the reverse primers 5'-AAGGCBAGTTGATRAAGTA-3' (Tm=56°C, 162 bp) or 5'-CGAAGACGAACARSGCCAT-3' (Tm=59°C, 182 bp). We propose to check *in vitro* specificity and sensitivity following Radomski et al. protocol (25), in order to detect ATP synthase subunit C which seems exclusively conserved in *Mycobacterium* spp. genome. If *in vitro* specificity and sensitivity are in accordance with our *in silico* results, our strategy of target design based on MycoHit software (Fig. 1) might be applied on other microorganism clusters.

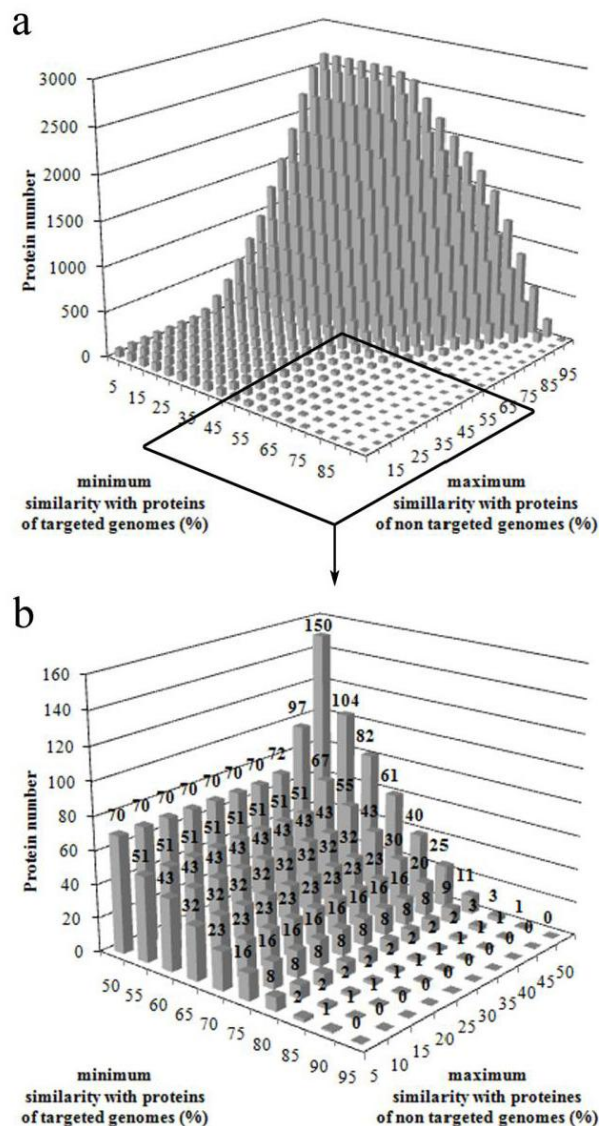


FIG. 2. Total (a) and partial representation (b) of the protein number of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv genome, according to their similarities with proteins of targeted mycobacterial genomes (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* CDC 1551, *M. tuberculosis* KZN 1435, *M. bovis* AF2122/97, *M. ulcerans* Agy99, *M. marinum* M, *M. avium* 104, *M. paratuberculosis* K10; *M. smegmatis* MC2 155, *M. abscessus* ATCC 19977, *M. gilvum* PYG-GCK, *M. vanbaalenii* PYR-1, *M. sp.* JLS, *M. sp.* KMS, *M. sp.* MCS), and proteins of non-targeted genomes including species of *Corynebacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* genera (*C. aurimucosum* ATCC 700975, *C. diphtheriae* NCTC 13129, *C. efficiens* YS-314, *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. jeikeium* K411, *C. kroppenstedtii* DSM 44385, *C. urealyticum* DSM 7109, *N. farcinica* IFM 10152, *Nocardioides* sp. JS614, *R. erythropolis* PR4, *R. jostii* RHA1, *R. opacus* B4).

TABLE 1. Similarity (%) of the most conserved mycobacterial proteins in *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Nocardia* sp. and *Rhodococcus* sp. genomes, in comparison with *M. tuberculosis* H37Rv genome.

protein locus (H37Rv genome) protein length (pb) gene or protein name	Rv1305 81 <i>atpE</i>	Rv0236A 57 -	Rv0197 762 -	Rv2172c 301 <i>lppM</i>	Rv0287 97 <i>esxG</i>	Rv0288 96 <i>esxH</i>	Rv3019c 96 <i>esxR</i>	Rv0285 102 PE5	Rv3022c 81 PPE48	Rv1304 250 <i>atpB</i>	Rv3392c 287 <i>cmA1</i>
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	99
<i>M. tuberculosis</i> KZN 1435	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>M. bovis</i> AF2122/97	100	100	99	100	100	100	100	100	98	100	100
<i>M. ulcerans</i> Agy99	100	96	86	90	96	92	93	93	83	96	87
<i>M. marinum</i> M	100	98	90	91	96	89	94	93	82	97	88
<i>M. avium</i> 104	96	96	91	91	91	89	91	92	83	93	82
<i>M. paratuberculosis</i> K10	96	96	91	91	91	89	91	92	85	92	82
<i>M. smegmatis</i> MC2 155	93	91	85	83	87	85	85	87	82	84	86
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	98	85	85	82	81	81	80	82	81	85	82
<i>M. gilvum</i> PYR-GCK	100	91	85	86	88	88	85	85	80	83	81
<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	93	91	85	87	89	85	83	82	83	84	81
<i>M. sp.</i> JLS	100	91	85	86	87	86	86	82	82	89	92
<i>M. sp.</i> KMS	100	91	86	86	88	86	86	82	82	89	91
<i>M. sp.</i> MCS	100	91	86	86	88	86	86	82	82	89	91
<i>C. aurimucosum</i> ATCC 700975	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46
<i>C. diphteriae</i> NCTC 13129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43	0
<i>C. efficiens</i> YS-314	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	47
<i>C. jeikeium</i> K411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45	0
<i>C. kroppenstedtii</i> DSM 44385	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41	47
<i>C. urealyticum</i> DSM 7109	0	0	38	0	0	0	0	0	0	44	41
<i>Nocardioides</i> sp. JS614	0	0	40	0	0	0	0	0	0	46	46
<i>N. farcinica</i> IFM 10152	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	44
<i>R. erythropolis</i> PR4	0	0	42	0	0	0	0	0	0	42	48
<i>R. jostii</i> RHAI	0	0	44	0	0	0	0	0	0	41	49
<i>R. opacus</i> B4	0	0	44	0	0	0	0	0	0	41	50

The remaining 8 proteins that were selected, namely ATP synthase subunit A, CMAS coded by the *cmA1* gene, lipoprotein coding by *lppM* gene, as well as PE, PPE and proteins coded by *esx* genes *esxG*, *esxH* and *esxR*, were highly conserved in MTC species but very polymorphous in NTM species (Supplementary material 1), which would not allow design of specific mycobacterial PCR primer pairs based on DNA sequence alignments (Data not shown). Indeed, PE and PPE family proteins represent about 4.2% of the *M. tuberculosis* genome (167 PE and PPE), 1.4% of *M. bovis* (57 PE and PPE), 0.9% of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (42 PE and PPE), 2.8% of *M. ulcerans* (115 PE and PPE), and 5.2% of *M. marinum* (281 PE and PPE) (4, 9, 17, 28), and are suspected to play a major antigenic role in immune response (5). Nevertheless, these proteins are very small and are polymorphous among NTM species (Table 1). PE and PPE family proteins are often associated with mycobacterial *esx* gene clusters, which encode ATP dependent specific secretion system (27), required to export specific members of the 6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6) protein family (28). Together, ATP dependent specific secretion system and ESAT-6 protein family, play a major role in the virulence and life cycle of mycobacteria (27, 28). Nevertheless, as observed for PE and PPE family proteins, proteins coded by *esx* genes *esxG*, *esxH* and *esxR* are very small and polymorphous among NTM species (Table 1). Although having higher length by comparison with those proteins, proteins CMAS coded by the *cmA1* gene and lipoprotein coding by *lppM* gene in *M. tuberculosis* H37Rv, are also polymorphous among NTM (Supplementary material 1). According to these results, other studies emphasized that cyclopropanation of the mycolic acids is common among pathogenic mycobacteria but rare among saprophytic species (11), and that polymorphism of mycolic acids, which are major components of the mycobacterial cell wall, is usually used for mycobacteria identification by high performance liquid chromatography (3, 29).

In conclusion, although our strategy do not take into account of the non-coding regions, as insertion sequences, repetitive units, non-functional RNA, and structural ribosomal RNAs, the comparison of whole bacterial genomes using MycoHit seems a very promising tool that could be used not only for mycobacteria but also for other bacterial or archaeal groups or species as whole sequenced genomes are starting to accumulate in databases. Especially metagenomic libraries from environmental samples are increasingly being used in microbial ecology studies (26), and allow to increase our knowledge to uncultured bacteria and archaea. MycoHit may then be used to design new primers for real-time PCR and for *in situ* hybridization

and DNA chips. We were able to design primer pairs and a probe that could be used to detect and quantify mycobacteria in environmental and clinical samples. These primers and probes still need to be tested *in vitro* in order to confirm their specificity and sensitivity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the PIREN-Seine program (<http://www.sisyphe.jussieu.fr/internet/piren/>), by the OPUR program (<http://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>), and by the grant CRECEP-S'TEA from the city of Paris. We thank Pr. Jacques Printems from the laboratory of analysis and applied mathematics (CNRS UMR 8050) in Paris Est University for access to his computer (MacPro3.1, Quad-Core Intel Xeon) in order to perform tblastn algorithm, which run between about 1 and 80 hours for each genome comparisons according to those similarity levels with the reference genome.

REFERENCES

- Adékambi, T., and M. Drancourt. 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *tpoB* gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2095-2105.
- Böddinghaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blocker, and E. C. Botzger. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28:1751-1759.
- Butler, W. R., D. G. Ahearn, and J. O. Kilburn. 1986. High-Performance Liquid Chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 21:182-185.
- Cole, S. T., Brosch, R., J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, and B. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* for the complete genome sequence. *Nat. Aust.* 44:5393-537.
- Denis, F., and C. Perronne. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques. Elsevier SAS, Paris.
- Dutil, S., M. Véillette, A. Mériaux, L. Lazure, J. Barbeau, and C. Duchaine. 2007. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: Low exposure despite dental unit contamination. *Environmental Microbiology* 9:2836-2843.
- Fukushima, M., K. Kakinuma, H. Hayashi, H. Nagai, K. Ito, and R. Kawaguchi. 2003. Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* 41:2605-15.
- García-Quintanilla, A., J. Gonzalez-Martín, G. Tundo, M. Espasa, and M. T. Jiménez de Anta. 2002. Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical

RADOMSKI ET AL.

in silico strategy for specific target design

- samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4646-4651.
9. Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, and R. G. Hewinson. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America **100**:7877-7882.
 10. Gomila, M., A. Ramirez, and J. Lalucat. 2007. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3787-3797.
 11. Grogan, D. W., and J. E. Cronan. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**:429-441.
 12. Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**:95-98.
 13. Holt, J. G. 1989. *Bergey's manual of systematic and bacteriology*, 1st ed, vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
 14. Kazda, J. 2009. The chronology of mycobacteria and the development of mycobacterial ecology, p. 1-11. In J. Kazda, I. Pavlik, J. O. Falkinham, and K. Hruska (ed.), *The ecology of Mycobacteria: Impact on animal's and human's health*, vol. 1. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
 15. Kim, B. J., S. K. Hong, K. H. Lee, Y. J. Yun, E. C. Kim, Y. G. Park, G. H. Bai, and Y. H. Kook. 2004. Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* **42**:1308-1312.
 16. Leys, N. M., A. Ryngaert, L. Bastiaens, P. Wattiau, E. M. Top, W. Verstraete, and D. Springael. 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**:375-388.
 17. Li, L., J. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. May, D. Alt, N. Banerji, S. Kanjilal, and V. Kapur. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America **102**:12344-13349.
 18. Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh, and C. K. Stover. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* **178**:1274-1282.
 19. Mendum, T. A., B. Z. Chilima, and P. R. Hirsch. 2000. The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. *FEMS Microbiology letters* **185**:189-192.
 20. Nieminen, T., J. Pakarinen, I. Tsitko, M. Salkinoja-Salonen, A. Breitenstein, T. Ali-Vehmas, and P. Neubauer. 2006. 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *J. Microbiol. Methods* **67**:44-55.
 21. Niva, M., A. Hernesmaa, K. Hahtela, M. Salkinoja-Salonen, K. Sivonen, and K. Haukka. 2006. Actinobacteria communities of boreal forest soil and lake water are rich in mycobacteria. *Boreal Environment Research* **11**:45-53.
 22. Nyren, P. 2007. The history of pyrosequencing. *Methods Mol. Biol.* **373**:1-14.
 23. Pryor, M., S. Springthorpe, S. Riffard, T. Brooks, Y. Huo, G. Davis, and S. A. Sattar. 2004. Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci. Technol.* **50**:83-90.
 24. Radomski, N., E. Cambau, L. Moulin, S. Haenn, R. Moilleron, and F. S. Lucas. 2010. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:3514-3520.
 25. Radomski, N., F. S. Lucas, R. Moilleron, E. Cambau, S. Haenn, and L. Moulin. 2010. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7348-7351.
 26. Riesenfeld, C. S., P. D. Schloss, and J. Handelsman. 2004. Metagenomics: Genome analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* **38**:525-552.
 27. Ripoll, F., S. Pasek, C. Schenowitz, C. Dossat, V. Barbe, M. Rottman, E. Macheras, B. Heym, J. L. Herrmann, M. Daffé, R. Brosch, J. Risler, and J. L. Gaillard. 2009. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **4**:1-12.
 28. Stinear, T. P., T. Seemann, P. F. Harrison, G. A. Jenkin, J. K. Davies, P. D. R. Johnson, Z. Abdellah, C. Arrowsmith, T. Chillingworth, C. Churcher, K. Clarke, A. Cronin, P. Davis, I. Goodhead, N. Holroyd, K. Jagels, A. Lord, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, D. Walker, B. White, S. Whitehead, P. L. C. Small, R. Brosch, L. Ramakrishnan, M. A. Fischbach, J. Parkhill, and S. T. Cole. 2010. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* **18**:729-741.
 29. Thibert, L., and S. Lapierre. 1993. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1759-1763.
 30. Tobler, N. E., M. Pfunder, K. Herzog, J. E. Frey, and M. Altwegg. 2006. Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-Microarray. *J. Microbiol. Methods* **66**:116-124.
 31. Uyttbroek, M., P. Breugelmans, M. Janssen, P. Wattiau, B. Joffe, U. Karlson, J. J. Ortega-Calvo, L. Bastiaens, A. Ryngaert, M. Hausner, and D. Springael. 2006. *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. *Environmental Microbiology* **8**:836-847.
 32. Uyttbroek, M., A. Spoden, J. J. Ortega-Calvo, K. Wouters, P. Wattiau, L. Bastiaens, and D. Springael. 2007. Differential responses of *Eubacterial*, *Mycobacterium*, and *Sphingomonas* communities in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. *Journal of Environmental Quality* **36**:1403-1411.
 33. Uyttbroek, M., S. Vermeir, P. Wattiau, A. Ryngaert, and D. Springael. 2007. Characterization of cultures enriched from acidic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at Low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3159-3164.
 34. Veyrier, F., D. Pletzer, C. Tureaune, and M. A. Behr. 2009. Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evolutionary Biology* **196**:1-14.
 35. Yao, J., H. Lin, H. Doddapaneni, and E. L. Civerolo. 2007. nWayComp: a genome-wide sequence comparison tool for multiple strains/species of phylogenetically related microorganisms. In *silico biology* **7**:195-200.
 36. Zolg, J. W., and S. Philippi-Schulz. 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2801-2812.

Supplementary material 1: Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

1 / Protein sequence alignment of *atpE* gene coding ATP synthase subunit C in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv1305 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1435)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. bovis</i> (AF2122/97)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. bovis</i> BCG (1172)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. leprae</i> (Bf4923)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. leprae</i> (TN)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. ulcerans</i> (Ag/99)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. marinum</i> (M)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. avium</i> (104)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. intracellulare</i> (13950)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. kansasii</i> (12478)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. abscessus</i> (19977)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. gilvum</i> (PVR-GCK)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. parascrofulaceum</i> (B44-614)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. vanbaalenii</i> (PVR-1)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. JLS</i>	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. KMS</i>	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. MCS</i>	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK

2 / Protein sequence alignment of unnamed gene coding small secreted protein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv0236A in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1435)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. bovis</i> (AF2122/97)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. bovis</i> BCG (1172)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. leprae</i> (Bf4923)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. leprae</i> (TN)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. ulcerans</i> (Ag/99)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. marinum</i> (M)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. avium</i> (104)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. intracellulare</i> (13950)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. kansasii</i> (12478)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. abscessus</i> (ATCC 19977)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. gilvum</i> (PVR-GCK)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. parascrofulaceum</i> (B44-614)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. vanbaalenii</i> (PVR-1)	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. JLS</i>	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. KMS</i>	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK
<i>M. MCS</i>	MDP-TIAAGGALIGGGLIMAGGALIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQRLLTTPFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFATPVK

Supplementary material 1: Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

3. a/ Protein sequence alignment of unnamed gene coding hypothetical oxidoreductase in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv0197 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

Strain	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100					
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	MTSSDWLPTACIL	CECNCGIVVQ	VDDRRLRARI	RGDKAH	PGSAGYTC	KNKALRLD	HYQNNRR	ALLSSPM	RRR	RADGTYEE	IDWDTA	IVIEIA	EGFKQ	IRDT	HGGD
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	TT	Q	E	T	A	R	S	G	T	A	L	P	I	R	M
<i>M. tuberculosis</i> (K2N 1435)	TT	Q	E	T	H	A	R	S	G	T	A	L	P	V	R
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	-MTGE	Q	S	E	E	A	Q	V	S	T	L	P	S	S	R
<i>M. tuberculosis</i> (AF212297)	-MTGE	Q	S	E	E	A	Q	V	S	T	L	P	S	S	R
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	D	TGE	HS	L	EN	T	KV	D	A	R	A	A	P	EF	PV
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	A	GTE	HS	L	EN	T	KV	D	A	R	A	A	P	EF	PV
<i>M. intracellulare</i> (13950)	A	GTE	HS	L	EN	T	KV	D	A	R	A	A	P	EF	PV
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	TT	Q	A	K	TEG	T	K	D	A	R	A	A	P	EF	PV
<i>M. kansasii</i> (12478)	-MTAE	E	H	P	E	QAS	R	T	E	A	R	T	P	S	F
<i>M. abscessus</i> (19977)	-MTGE	Q	E	A	E	A	A	Q	S	G	T	L	P	S	F
<i>M. gilvum</i> (PYR-GCK)	EQTGQ	Q	E	G	A	E	G	S	D	A	A	Q	P	S	S
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)	PLGN	Q	E	E	G	S	D	A	A	Q	P	S	S	S	A
<i>M. JLS</i>	PLKG	Q	E	E	G	S	D	A	A	Q	P	S	S	S	A
<i>M. KMS</i>	PLKG	Q	E	E	G	S	D	A	A	Q	P	S	S	S	A
<i>M. MCS</i>	PLKG	Q	E	E	G	S	D	A	A	Q	P	S	S	S	A
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	K	I	F	Y	G	G	G	G	G	G	N	H	L	G	G
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. tuberculosis</i> (K2N 1435)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. bovis</i> BCG (1172)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. ulcerans</i> (49/99)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. marinum</i> (M)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. avium</i> (104)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. intracellulare</i> (13950)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. kansasii</i> (12478)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. abscessus</i> (19977)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. gilvum</i> (PYR-GCK)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. vanbaalenii</i> (PYR-1)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. JLS</i>	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. KMS</i>	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. MCS</i>	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	K	I	F	Y	G	G	G	G	G	G	N	H	L	G	G
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. tuberculosis</i> (K2N 1435)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. bovis</i> BCG (1172)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. ulcerans</i> (49/99)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. marinum</i> (M)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. avium</i> (104)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. intracellulare</i> (13950)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. kansasii</i> (12478)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. abscessus</i> (19977)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. gilvum</i> (PYR-GCK)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. vanbaalenii</i> (PYR-1)	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. JLS</i>	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. KMS</i>	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>M. MCS</i>	R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Supplementary material 1 : Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

3.c/ Protein sequence alignment of unnamed gene coding hypothetical oxidoreductase in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv0197 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

Protein Source	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																																																																											
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1435)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. bovis</i> (AF212297)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. bovis</i> BCG (1172)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. ulcerans</i> (Ag/99)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. marinum</i> (M)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. avium</i> (104)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. intracellulare</i> (13950)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. kansasii</i> (12478)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. abscessus</i> (19977)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. gilvum</i> (PVR-GC)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. vanbaalenii</i> (PVR-1)	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. JLS</i>	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. KMS</i>	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. MCS</i>	L	M	V	V	V	V	A	M	T	E	T	A	R	L	A	H	V	L	P	A	A	S	Q	F	E	K	P	E	A	T	F	F	N	F	F	E	P	R	N	G	F	Q	L	R	R	P	L	F	P	L	D	G	T	L	P	E	P	E	I	W	A	R	L	V	R	A	L	G	V	V	E	A	D	L	R	P	L	R	E	A	A	G	G	R	O	A	V	T	E	A	F	L	A	A	
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	A	T	N	P	T	V	A	K	L	L	T	A	Y	V	L	Y	E	T	L	G	P	T	L	P	D	G	L	A	A	L	W	G	L	A	K	T	A	M	A	Y	P	D	A	V	R	R	A	G	H	A	D	G	N	A	L	F	D	A	I	L	E	R	P	S	G	V	T	F	V	H	N	Y	E	D	D	F	A	L	I	S	H	P	D	K	I	A	L	E	I	P	E	M	L	A	E
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	A	T	N	P	T	V	A	K	L	L	T	A	Y	V	L	Y	E	T	L	G	P	T	L	P	D	G	L	A	A	L	W	G	L	A	K	T	A	M	A	Y	P	D	A	V	R	R	A	G	H	A	D	G	N	A	L	F	D	A	I	L	E	R	P	S	G	V	T	F	V	H	N	Y	E	D	D	F	A	L	I	S	H	P	D	K	I	A	L	E	I	P	E	M	L	A	E
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1435)	A	T	N	P	T	V	A	K	L	L	T	A	Y	V	L	Y	E	T	L	G	P	T	L	P	D	G	L	A	A	L	W	G	L	A	K	T	A	M	A	Y	P	D	A	V	R	R	A	G	H	A	D	G	N	A	L	F	D	A	I	L	E</																																		

Supplementary material 1 : Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

4.a/ Protein sequence alignment of *lppM* gene coding hypothetical cal lipoprotein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv2172c in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	MTLNTLIALELVPPNLEGGKERAIEDARKVVOVSAASGLDGRIRHVMMPGIIAEDDDRPIPMOPKLDVLDVFWIIKPELAGVHGGLCTQVTAFMDEPSLHRR
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	V.....
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1439)	V.....
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	V.....
<i>M. bovis</i> (AF212297)
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)
<i>M. bovis</i> BCG (172)
<i>M. leprae</i> (B4923)
<i>M. leprae</i> (TN)
<i>M. ulcerans</i> (Ag99)
<i>M. marinum</i> (M)
<i>M. avium</i> (104)
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)
<i>M. paratuberculosis</i> (13990)
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)
<i>M. abscessus</i> (12478)
<i>M. abscessus</i> (19977)
<i>M. gilvum</i> (PYR-GCK)
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)
<i>M. vanbaalenii</i> (PYR-1)
<i>M. JLS</i>
<i>M. KMS</i>
<i>M. MCS</i>
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	LVDLSDAGMEGIVFVGVPRTMODGEGSGVAPPTDALSLYRQLVANRGVIVPTRDGEQGRINFKCSRGATYGMITOLLYSDAIVGFLREFARTTEHRPEILL
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	A.....
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1439)	A.....
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	A.....
<i>M. bovis</i> (AF212297)
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)
<i>M. bovis</i> BCG (172)
<i>M. leprae</i> (B4923)
<i>M. leprae</i> (TN)
<i>M. ulcerans</i> (Ag99)
<i>M. marinum</i> (M)
<i>M. avium</i> (104)
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)
<i>M. paratuberculosis</i> (13990)
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)
<i>M. abscessus</i> (12478)
<i>M. abscessus</i> (19977)
<i>M. gilvum</i> (PYR-GCK)
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)
<i>M. vanbaalenii</i> (PYR-1)
<i>M. JLS</i>
<i>M. KMS</i>
<i>M. MCS</i>

Supplementary material 1 : Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

4. b/ Protein sequence alignment of *lppM* gene coding hypothetical lipoprtein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv2172c in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	S F G F V P K V E T R I G L I N W L I Q D P G A A V A D E Q A F V Q K L A G S E P A R R R R L M V D L Y K R V L D G V A D L G F P L S I H L E A T Y G V S A A A F E T F A E M L A Y W S P A E P G K P
<i>M. tuberculosis</i> (H37Re)	
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1435)	
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	
<i>M. bovis</i> (AF212297)	
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	
<i>M. leprae</i> (Bd4923)	
<i>M. leprae</i> (TN)	
<i>M. ulcerans</i> (Ag9/99)	
<i>M. marinum</i> (M)	
<i>M. avium</i> (T04)	
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	
<i>M. intracellulare</i> (13990)	
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	
<i>M. kanssasii</i> (12478)	
<i>M. abscessus</i> (19197)	
<i>M. gilvum</i> (PVR-GC4)	
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)	
<i>M. vanbaalenii</i> (PVR-1)	
<i>M. JLS</i>	
<i>M. KMS</i>	
<i>M. MCS</i>	

5/ Protein sequence alignment of *esxG* gene coding hypothetical PE family protein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv0287 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	M S L L D A H I P O L V A S Q S A F A A K A K A G L M R H T I G Q A E Q A A M S A Q A F H Q G E S S A A F Q A A H A R F V A A A A K V N T L L D V A Q A N L G E A A G T Y V A A D A A A S T Y T - G F
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1435)	
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	
<i>M. bovis</i> (AF212297)	
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	
<i>M. bovis</i> BCG (1172)	
<i>M. leprae</i> (Bd4923)	
<i>M. leprae</i> (TN)	
<i>M. ulcerans</i> (Ag9/99)	
<i>M. marinum</i> (M)	
<i>M. avium</i> (T04)	
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	
<i>M. intracellulare</i> (13990)	
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)	
<i>M. kanssasii</i> (12478)	
<i>M. abscessus</i> (19197)	
<i>M. gilvum</i> (PVR-GC4)	
<i>M. parascrofulaceum</i> (BAA-614)	
<i>M. vanbaalenii</i> (PVR-1)	
<i>M. JLS</i>	
<i>M. KMS</i>	
<i>M. MCS</i>	

Supplementary material 1: Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

6/ Protein sequence alignment of *esxH* gene coding hypothetical PE family protein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv0288 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

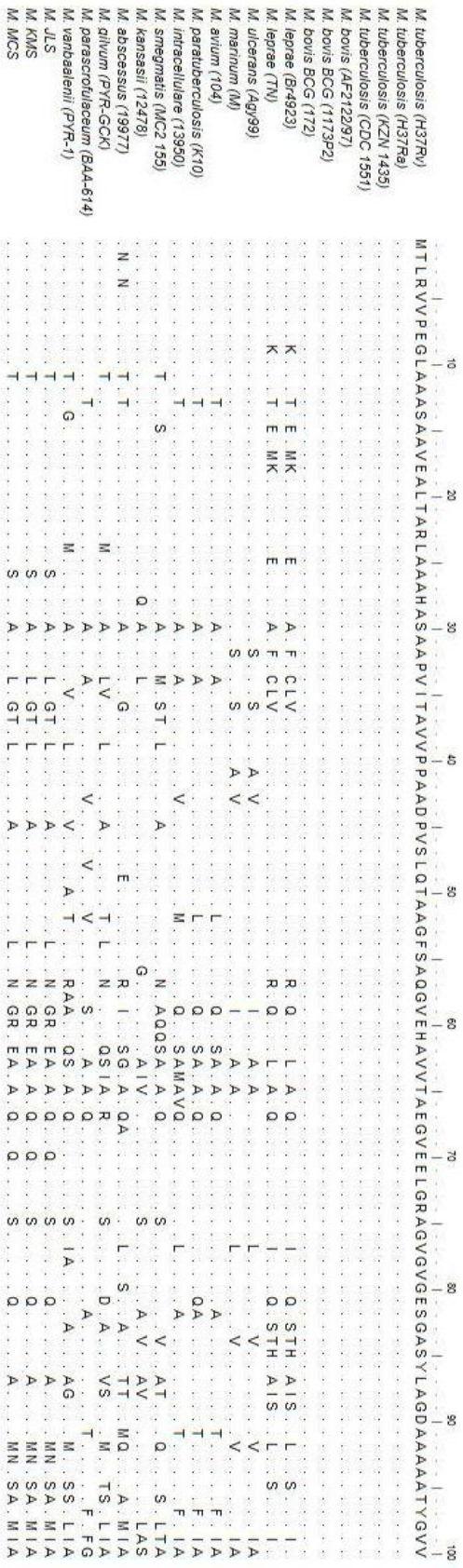
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37	MSQIMVNYVPAMLGHAGDMAGYAGTLLQSLGAEIAYEQAAALQSAWQGDGTGITYQAWQDAQWNQAMEDLVRYAYQSMGTHESNTMAMLRDGAEA	AKKWWG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC		
<i>Mycobacterium bovis</i> AF-2122/97		
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. P		
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. T		
<i>Mycobacterium leprae</i> Bv4923		
<i>Mycobacterium leprae</i> TN		
<i>Mycobacterium ulcerans</i> Ag9/99		
<i>Mycobacterium marinum</i> M		
<i>Mycobacterium avium</i> 104		
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. par		
<i>Mycobacterium intracellulare</i> A		
<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. M		
<i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 121		
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 1		
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK		
<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>		
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-		
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS		
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS		
<i>Mycobacterium</i> sp. MCS		

7/ Protein sequence alignment of *esxR* gene coding hypothetical PE family protein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv3019c in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

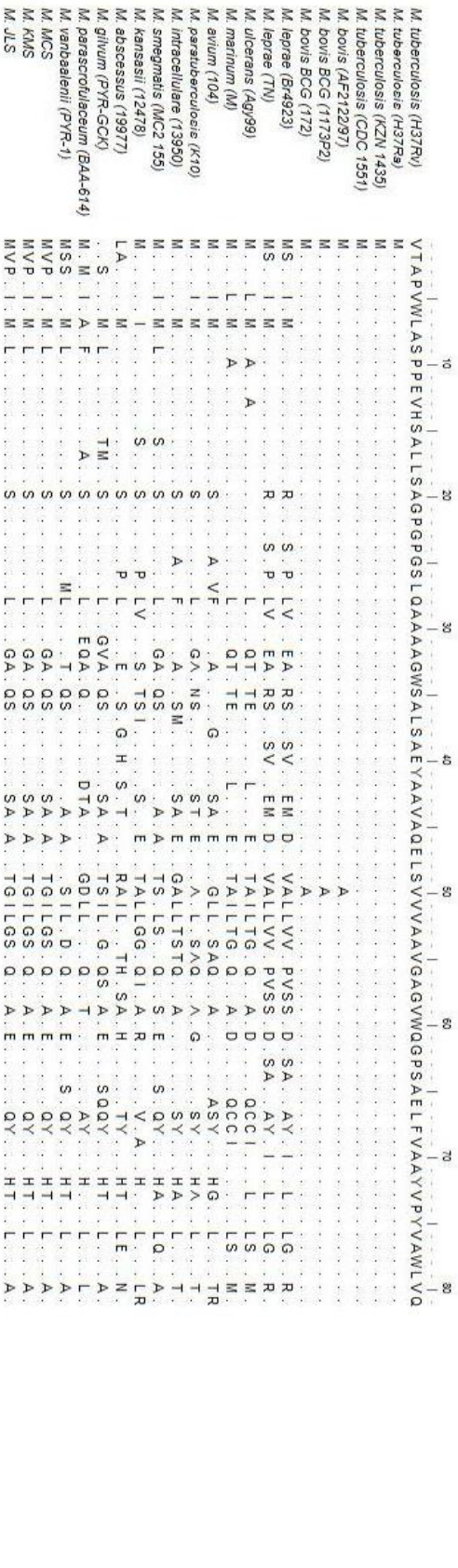
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	MSQIMVNYVPAMMAHAGDMAGYAGTLLQSLGADIASEQAVLSSAWQGDGTGITYQGWQDQWNQALLEDLVRYAYQSMGTHESNTMAMLRDGAEA	AKKWWG
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)		
<i>M. tuberculosis</i> (KCN 1435)		
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)		
<i>M. bovis</i> (AF-2122/97)		
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)		
<i>M. bovis</i> BCG (1172)		
<i>M. leprae</i> (Bv4923)		
<i>M. leprae</i> (TN)		
<i>M. ulcerans</i> (Ag9/99)		
<i>M. marinum</i> (M)		
<i>M. avium</i> (104)		
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)		
<i>M. intracellulare</i> (13950)		
<i>M. smegmatis</i> (MC2 155)		
<i>M. kansasii</i> (12478)		
<i>M. abscessus</i> (19917)		
<i>M. gilvum</i> (PYR-GCK)		
<i>M. parascrofulaceum</i> (B44-614)		
<i>M. vanbaalenii</i> (PYR-1)		
<i>M. JLS</i>		
<i>M. KMS</i>		
<i>M. MCS</i>		

Supplementary material 1 : Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

8/ Protein sequence alignment of PPE5 gene coding hypothetical PE family protein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv0285 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).



9/ Protein sequence alignment of PPE48 gene coding hypothetical PPE family protein in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv3022c in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).



Supplementary material 1 : Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

1.0.b/ Protein sequence alignment of *atpB* gene coding ATP synthase subunit A in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv1304 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

M. tuberculosis (H37Rv)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. tuberculosis (H37Ra)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. tuberculosis (KZN 1435)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. tuberculosis (CDC 1551)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. bovis (AF212297)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. bovis BCG (1173P2)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. bovis BCG (1172)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. leprae (Br4923)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. leprae (TN)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. ulcerans (Ag/99)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. marinum (M)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. avium (104)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. paratuberculosis (K10)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. intracellulare (13950)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. smegmatis (MC2 155)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. smegmatis (MC2 155)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. abscessus (19977)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. gilvum (PYR-GCk)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. parascrofulaceum (B44-614)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. vanbaalenii (PYR-1)	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. JLS	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. KMS	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. MCS	TCAC	TTCT	CTGG	CCAG	GGTGA	AACTGG	TTGAC	CGTCC	GATG	TATCC	CGATG	CGGA	AACAT	CTC	CGCC	CGAG	CCCG	GGTGA	GAG	TACT	TCA	TACC	CGCT	CGT	AGAC	TTCT	CTCG	
M. tuberculosis (H37Rv)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. tuberculosis (H37Ra)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. tuberculosis (KZN 1435)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. tuberculosis (CDC 1551)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. bovis (AF212297)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. bovis BCG (1173P2)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. bovis BCG (1172)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. leprae (Br4923)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. leprae (TN)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. ulcerans (Ag/99)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. marinum (M)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. avium (104)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. paratuberculosis (K10)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. intracellulare (13950)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. smegmatis (MC2 155)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. smegmatis (MC2 155)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. abscessus (19977)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. gilvum (PYR-GCk)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. parascrofulaceum (B44-614)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. vanbaalenii (PYR-1)	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. JLS	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. KMS	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA
M. MCS	GATT	GCAG	CGCG	GATG	GGCT	GGCC	CTGG	CCCT	GTGG	CCCT	GTG	CCAC	CGCC	GGAC	CGAG	GGTTC	GAG	GGT	TTT	CG	CAT	AG	TG	CG	CGC	TG	CGT	GA

Supplementary material 1 : Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

10.c Protein sequence alignment of *atpB* gene coding ATP synthase subunit A in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv1304 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

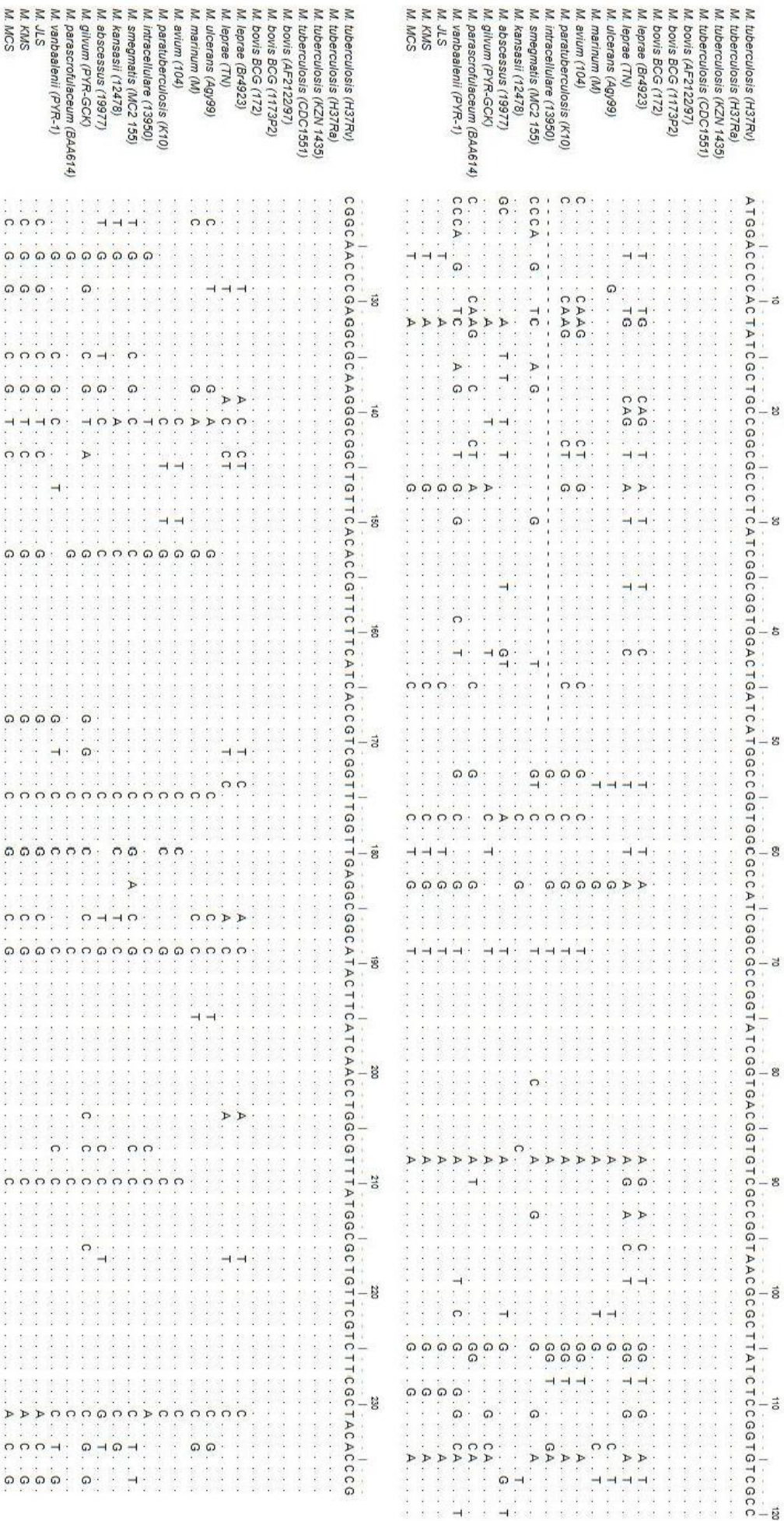
M. tuberculosis (H37Rv)	TGACGTCGATATTTTCCACCGCGCGGCGGATTCATGGTGGCCGCCAGCCGCGAGCCGAGCGTCCACACAGTGTGATGCGCCCGGCTGGCAATCCGAGTTTGCCCGGCGC
M. tuberculosis (H37Ra)	
M. tuberculosis (KZN 1435)	
M. tuberculosis (CDC 1551)	
M. bovis (AF212297)	
M. bovis BCG (1173P2)	
M. bovis BCG (172)	
M. leprae (Bf4923)	
M. leprae (TN)	
M. ulcerans (Ag/99)	
M. marinum (M)	
M. avium (104)	
M. paratuberculosis (K10)	
M. intracellulare (13950)	
M. smegmatis (MC2 155)	
M. smegmatis (19977)	
M. gilvum (PYR-SGX)	
M. parascrofulaceum (B44-614)	
M. vanbaalenii (PYR-1)	
M. JLS	
M. KMS	
M. MCS	
M. tuberculosis (H37Rv)	
M. tuberculosis (H37Ra)	
M. tuberculosis (KZN 1435)	
M. tuberculosis (CDC 1551)	
M. bovis (AF212297)	
M. bovis BCG (1173P2)	
M. bovis BCG (172)	
M. leprae (Bf4923)	
M. leprae (TN)	
M. ulcerans (Ag/99)	
M. marinum (M)	
M. avium (104)	
M. paratuberculosis (K10)	
M. intracellulare (13950)	
M. smegmatis (MC2 155)	
M. smegmatis (19977)	
M. gilvum (PYR-SGX)	
M. parascrofulaceum (B44-614)	
M. vanbaalenii (PYR-1)	
M. JLS	
M. KMS	
M. MCS	

Supplementary material 1 : Protein sequence alignment of conserved proteins in *Mycobacterium* spp. genomes.

10.d/ Protein sequence alignment of *atpB* gene coding ATP synthase subunit A in *Mycobacterium* genome (locus tag Rv1304 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).

	810	820	830	840	850	860
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. tuberculosis</i> (KZN 1435)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. tuberculosis</i> (CDC 1551)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. bovis</i> (AF212297)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. bovis</i> BCG (1173P2)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. bovis</i> BCG (1172)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. leprae</i> (B4923)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. leprae</i> (TN)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. ulcerans</i> (A9y99)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. marinum</i> (M)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. avium</i> (104)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. paratuberculosis</i> (K10)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. intracellulare</i> (13950)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. smegmatis</i> (MC2 159)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. kansasii</i> (12478)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. abscessus</i> (19977)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. gilvum</i> (PVR-GCX)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. parascrofulaceum</i> (BA4-614)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. vanbaalenii</i> (PVR-1)	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. JLS</i>	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. KMS</i>	AA	GC	GC	GC	GC	GC
<i>M. MCS</i>	AA	GC	GC	GC	GC	GC

Supplementary material 2: DNA sequence alignment of *atpE* gene coding ATP synthase subunit C in *Mycobacterium* genome (locus tag RV1305 in genome of *M. tuberculosis* H37Rv).



III / Conclusion

Même si *M. avium* est l'espèce la plus étudiée des NTM en raison de sa pathogénicité et son occurrence, le schéma dichotomique de décision des outils analytiques à mettre en œuvre en vue de surveiller *M. avium* dans l'environnement a permis de souligner le manque d'outils de détection, de quantification, et de caractérisation des populations de cette espèce (chapitre IV §II.1 / article ⑦). Effectivement, la surveillance de *M. avium* dans l'environnement a historiquement été réalisée par des outils de détection par bactériologie, ainsi que des outils de caractérisation des souches isolées par sérologie, enzymologie et plus récemment par biologie moléculaire (chapitre I §II / et Annexe 1). Par conséquent, l'avenir de l'étude de *M. avium* dans l'environnement réside dans le développement et l'application de méthodes moléculaires (chapitre II §II.2 / article ②) de détection, de quantification et de caractérisation des populations, qui s'affranchissent des biais engendrés par les méthodes de culture conventionnelles (chapitre II §II.1 / article ①). Néanmoins, il est à souligner que, comme observé au cours de la détection du genre *Mycobacterium* dans des échantillons environnementaux par biologie moléculaire (chapitre III §II.1 / article ④, §II.2 / article ⑤ et §II.3 / article ⑥), l'étape d'extraction des acides nucléiques est l'étape limitante qui nécessitera donc des améliorations dans le futur (chapitre II §II.3 / article ③). A ce sujet, il doit être souligné que les faibles volumes d'eau (chapitre III §II.1 / article ④ et §II.3 / article ⑥) et les faibles quantités de sol analysés (chapitre III §II.2 / article ⑤) ne permettent peut-être pas d'obtenir des résultats représentatifs. Néanmoins, l'augmentation du volume d'eau et de la quantité de sol analysés ne permettrait pas d'améliorer cette représentativité, car ils engendreraient de la même façon une augmentation de la quantité d'ADN extrait qui devrait donc être dilué d'avantage pour lever les phénomènes d'inhibition de la PCR. Cette augmentation du nombre de dilutions engendrerait inexorablement une augmentation des erreurs de mesure.

Le schéma dichotomique de décision des outils analytiques à mettre en œuvre en vue de surveiller *M. avium* dans l'environnement (chapitre IV §II.1 / article ⑦) est tout à fait applicable à d'autres microorganismes pathogènes. Toutefois cela nécessiterait une étude exhaustive de la littérature à leur sujet, afin de définir clairement ce qui est de l'ordre du réalisable au regard des méthodes existantes. Par ailleurs, l'étude du risque que représente les microorganismes pathogènes de l'environnement, nécessite de pouvoir comparer les densités mesurées dans l'environnement aux données de doses infectieuses en tenant compte de l'exposition de la population. Concernant les mycobactéries, il n'existe pas actuellement de données sur les doses infectieuses, ni de données claires sur les facteurs de pathogénicité. Ces deux points doivent donc aussi être d'avantage étudiés afin de répondre au mieux à l'évaluation du risque que représente l'exposition environnementale aux espèces de NTM.

En raison du développement du séquençage à haut débit, le nombre de génomes totalement séquencés est en constante augmentation. Ainsi, l'utilisation de ces nouvelles données pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles de détection pouvant palier les faibles sensibilité et spécificité des cibles proposées sur la base des connaissances de gènes polymorphes initialement utilisés dans un objectif d'identification (chapitre IV §II.2 / article ⑧). La comparaison à un génome de référence, des protéines de génomes ciblés, d'une part, et des protéines de génomes non-ciblés, d'autre part, pourrait passer par l'utilisation du logiciel MycoHit, permettant à la fois cette comparaison et le triage des protéines du génome de référence en fonction de requêtes de similarité vis-à-vis des autres génomes comparés. Dans le cas du genre *Mycobacterium*, cette analyse *in silico* a confirmé que les gènes sur la base desquels sont développées des méthodes de détection (*gyrA*, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB*, et *sodA*) sont conservés au sein de ce genre, mais également qu'ils sont présents sous des formes similaires au sein de genre non-mycobactériens apparentés comme *Corynebacterium*, *Rhodococcus* ou *Nocardia*. Cette analyse a, par ailleurs, montré que quelques protéines étaient exclusivement conservées dans les génomes des espèces de mycobactéries, comme,

par exemple, des protéines liées à la virulence telles que la synthase de l'acide mycolique cyclopropane (cyclopropane mycolic acid synthase: CMAS) codée par le gène *cmaA1* (cyclopropane mycolic acid A1), des protéines des familles PE et PEE codées par les gènes *esx*, et la lipoprotéine M codée par le gène *lppM*, ou des protéines non directement liées à la virulence comme les sous-unités A et C de la synthase de l'ATP, une oxydoréductase et une protéine de sécrétion non identifiée. Parmi les séquences ADN de ces protéines potentiellement caractéristiques du genre *Mycobacterium*, seule la sous-unité C de la synthase de l'ATP a permis de proposer des amorces PCR et une sonde d'hydrolyse dans un objectif de détection. Si la vérification de la spécificité et de la sensibilité de cette cible est établie *in vitro* (chapitre II §II.2 / article ②), la stratégie *in silico* proposée d'identification de marqueurs (chapitre IV §II.2 / article ⑧) pourrait alors être appliquée à d'autres microorganismes pathogènes dans un objectif de surveillance dans l'environnement (chapitre IV §II.1 / article ⑦).

*« Si chaque découverte entraîne plus de questions qu'elle n'en résout,
la part d'inconnu s'accroît à mesure que nos connaissances
augmentent »*

Pierre Vathomme

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

La comparaison des méthodes de culture des mycobactéries non-tuberculeuses (chapitre II §II.1 / article ①), de quantification moléculaire du genre *Mycobacterium* (chapitre II §II.2 / article ②) et d'extraction d'ADN mycobactérien (chapitre II §II.3 / article ③), nous ont conduit, dans un objectif de quantification, à préférer les méthodes moléculaires aux méthodes par bactériologie. Effectivement, contrairement aux méthodes bactériologiques, la méthode de qPCR développée a permis de quantifier à la fois les mycobactéries à croissance rapides et lentes dans des échantillons environnementaux (chapitre II §II.2 / article ②), alors qu'uniquement des mycobactéries à croissance rapides ont été isolées par bactériologie en raison de la présence de microorganismes interférents qui se développaient plus rapidement sur les milieux de culture que les mycobactéries à croissances lentes (chapitre II §II.1 / article ①). De plus la détection et la quantification des mycobactéries non-tuberculeuses par biologie moléculaire sont beaucoup plus rapides que l'isolement des mycobactéries non-tuberculeuses par bactériologie qui nécessite des temps de culture très importants comme décrit dans la discussion sur les défis de la surveillance des microorganismes pathogènes dans l'environnement (chapitre IV §II.1 / article ⑦). Néanmoins il subsiste plusieurs biais avec cette technique de quantification moléculaire en particulier l'extraction d'ADN et la sensibilité de la méthode qui entraînent une sous-estimation des densités de mycobactéries non-tuberculeuses présentes dans les échantillons.

Bien qu'étant la méthode la plus efficace parmi celles comparées, il s'est avéré que la méthode d'extraction utilisée perdait beaucoup d'ADN mycobactérien (chapitre II §II.3 / article ③). De nombreux efforts doivent donc être mis en œuvre dans l'amélioration des méthodes d'extraction d'ADN dans l'environnement. En raison de la richesse lipidique de la paroi mycobactérienne, d'autres détergents que ceux déjà comparés et des lipases pourraient, par exemple, être utilisés pour déstabiliser et lyser cette dernière. Des méthodes physiques plus drastiques comme les chocs thermiques et les ultrasons pourraient aussi améliorer la lyse de la paroi mycobactérienne. Concernant la méthode de purification de l'ADN, nous avons vu que la méthode au phénol/chloroforme permettait de perdre moins d'ADN que la méthode sur membrane de silice proposée par le constructeur Mo-Bio. Cependant afin de minimiser l'utilisation de solvants, il pourrait être intéressant de modifier le protocole d'utilisation du kit d'extraction d'ADN, comme le font certains chercheurs qui augmentent le rendement d'extraction d'ADN trace à partir de poils ou de fèces d'espèces menacées en modifiant le protocole d'un kit d'extraction d'ADN vendu par Qiagen (Regnaut *et al.* 2005 ; Fumagalli *et al.* 2009).

Par ailleurs, la méthode de qPCR utilisée ne permet pas de détecter toutes les espèces de mycobactéries non-tuberculeuses (chapitre II §II.2 / article ②), et en conséquence une procédure de détection *in silico* de cibles spécifiques et sensibles a été proposée pour améliorer cette méthode (chapitre IV §II.2 / article ⑧). En effet, beaucoup de cibles moléculaires de détection sont basées sur les connaissances des séquences de gènes de ménage historiquement utilisées dans des objectifs d'identification. Ainsi, la spécificité et la sensibilité de ces cibles ne sont que basées sur le polymorphisme de ces gènes communs aux organismes vivants et ne permettent donc pas aux méthodes d'être à la fois totalement sensibles et totalement spécifiques (chapitre II §II.2 / article ②).

Sur la base de l'augmentation du nombre de génomes totalement séquencés en raison de l'apparition du séquençage à haut débit, la procédure proposée d'identification de cibles de détection a permis de souligner que la sous-unité C de la synthase de l'adénosine triphosphate semble caractéristique du genre *Mycobacterium* (chapitre IV §II.2 / article ⑧). Les gènes codant la synthase d'adénosine triphosphate codent effectivement une fonction commune aux êtres vivants, mais la sous-unité C, codée par l'un des gènes de cet opéron, semble caractéristique des mycobactéries et la composition nucléotidique du gène codant cette sous-unité permettrait de dessiner de nouvelles amorces PCR et une nouvelle sonde afin de détecter ce groupe bactérien. D'autres cibles protéiques, notamment des cibles liées à la virulence, ont été décrites grâce à cette procédure *in silico*, mais elles présentaient un trop fort

polymorphisme nucléique pour dessiner des amorces PCR peu dégénérées (chapitre IV §II.2 / article ⑧). Néanmoins, ces cibles de virulence caractéristiques des mycobactéries (synthèses de l'acide mycolique cyclopropane codées par le gène *cmaA1*, protéines des familles Proline-Glutamine et Proline-Proline-Glutamine codées par les gènes *esx*, et la lipoprotéine M codée par le gène *lppM*) pourraient être utilisées dans des méthodes de dosages protéiques dans le but de détecter le genre *Mycobacterium*. Des biocapteurs utilisant des anticorps spécifiques de ces antigènes pourraient être développés.

L'arbre de décision sur l'adaptation des méthodes médicales aux échantillons environnementaux (chapitre IV §II.1 / article ⑦) et la procédure de recherche de cibles de détection par comparaison des génomes (chapitre IV §II.2 / article ⑧) pourraient aussi être appliqués pour la surveillance d'autres microorganismes pathogènes. La méthode de recherche de cibles par comparaison des génomes offre aussi des potentialités intéressantes pour l'écologie microbienne, notamment pour le développement d'amorces et sondes plus spécifiques pour certains groupes de bactéries et d'archées. Le nombre croissant de banques métagénomiques dans les environnements terrestres et aquatiques et le séquençage croissant de nouveaux génomes bactériens offrent des possibilités d'améliorer la détection des microorganismes dans les environnements naturelles et fabriqués par l'Homme.

Le développement d'outils analytiques, en particulier la qPCR (chapitre II §II.2 / article ②), a permis de montrer qu'une station d'épuration constituée d'une étape de décantation physico-chimique lamellaire suivie de trois étages d'épuration biologique (élimination du carbone, des nitrates puis des nitrites), éliminait efficacement les mycobactéries non-tuberculeuses de l'eau usée en temps sec (chapitre III §II.1 / article ④). Ainsi, ce traitement est nécessaire pour préserver l'eau de surface de cette source ponctuelle de mycobactéries non-tuberculeuses. Dans l'objectif de compléter cette étude de station d'épuration (Figure 8), il serait intéressant de confirmer le modèle hydrophobe proposé (chapitre III §II.1 / article ④) en réitérant la méthodologie que nous avons suivie sur d'autres stations d'épuration présentant d'autres procédés de traitement comme la décantation classique non physico-chimique et l'épuration biologique par boues activées.

De plus, l'étude du comportement par temps de pluie des mycobactéries non-tuberculeuses dans les stations d'épuration permettrait de vérifier si l'effet de dilution due aux eaux de pluie n'entraînerait pas une modification de l'efficacité de traitement, en particulier vis-à-vis des microorganismes hydrophobes comme les mycobactéries non-tuberculeuses. En effet, en temps de pluie la fraction attachée aux particules sédimentables augmente dans les eaux de surface (Krometis *et al.* 2007). Par ailleurs dans les réseaux unitaires, le ruissellement peut décrocher et remettre en suspension le biofilm et les sédiments (Gromaire *et al.* 2008). Les mycobactéries étant hydrophobes sont fortement associées à cette fraction sédimentable et donc leur traitement par temps de pluie par les procédés de décantation et de biofiltration sera dépendant du devenir des matières en suspension et des colloïdes. Au sujet de cette hydrophobicité, il est à noter que nos résultats suggèrent que les indicateurs conventionnels de contamination fécale, *E. coli* et *Enterococcus*, ne permettent pas de prédire le comportement des mycobactéries non-tuberculeuses dans une station d'épuration. Ce résultat suggère que la connaissance du comportement hydrophobe ou hydrophile des différentes espèces de pathogènes pourrait servir à prédire leur devenir dans les effluents de station d'épuration en se basant sur plusieurs organismes modèles. Par ailleurs, les fortes densités de mycobactéries non-tuberculeuses estimées dans les boues de station d'épuration (chapitre III §II.1 / article ④) suggèrent qu'il est nécessaire de contrôler les mycobactéries non-tuberculeuses dans les filières qui les traitent avant d'épandre ces dernières sur les sols des zones rurales. Cette investigation devrait être menée dans des zones rurales dont les sols présentent des pH faibles (pH 3-5) ainsi que des teneurs fortes en eau, matières organiques et fer comme cela a été démontré durant l'étude des sols (chapitre III §II.2 / article ⑤).

Du fait de la présence de mycobactéries non-tuberculeuses dans les eaux usées, les déversoirs d'orages peuvent constituer une source de mycobactéries non-tuberculeuses dans

les bassins versants lorsque des rejets urbains de temps de pluie sont déversés, la station d'épuration ne pouvant pas toujours traiter la totalité de l'effluent lorsque les débits sont trop importants (Figure 8). Nous avons réalisé une campagne d'échantillonnage au cours d'un orage sur le déversoir de Clichy et suivi le panache du déversement en Seine. Nos résultats ont montré que des mycobactéries non-tuberculeuses étaient présentes dans les rejets, cependant elles n'étaient pas quantifiables de façon reproductible et nos résultats n'ont donc pas été présentés dans ce mémoire. La représentativité d'un seul événement pluvieux échantillonné et sa généralisation posent question. Il serait donc intéressant de réaliser plusieurs campagnes sur les déversoirs d'orage lors de forts événements pluvieux afin de vérifier la contribution de cette source ponctuelle. Toutefois il est à noter que les fortes contraintes liées à l'échantillonnage par temps de pluie rendent rares les études sur les microorganismes en général et sur les mycobactéries non-tuberculeuses en particulier.

Concernant les sources diffuses via le ruissellement (Figure 8), deux autres études ont concerné les sols en temps sec et les eaux de surface par temps de pluie, deux paramètres qui régissent l'apport de polluants dans le milieu récepteur via les ruissellements. Nos résultats ont montré que les sols ruraux acides probablement riches en acides humiques, comme ceux des forêts tourbeuses et ceux des marécages, sont propices aux mycobactéries non-tuberculeuses (chapitre III §II.2 / article ⑤) et que les densités de mycobactéries non-tuberculeuses ne différaient pas entre les zones rurales, et péri-urbaines que nous avons échantillonnées sur le bassin versant de la Marne durant un événement pluvieux (chapitre III §II.3 / article ⑥). Cependant nous avons pu montrer que certains affluents de la Marne présentaient des concentrations élevées en mycobactéries non-tuberculeuses qui pouvaient impacter la qualité de la Marne en temps sec, ces densités diminuant au cours de l'événement pluvieux. D'après la littérature, les sols riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques pourraient constituer une source dans les zones urbaines et péri-urbaines denses (Figure 8), mais aucune mycobactérie non-tuberculeuse n'a été détectée dans les sols urbains testés (chapitre III §II.2 / article ⑤). Ainsi, de futures études devraient intégrer, d'une part, la comparaison des densités de mycobactéries non-tuberculeuses dans les sols, mais aussi la biodisponibilité du carbone des sources biotiques (carbone organique) et xénobiotiques (carbone d'hydrocarbures aromatiques polycycliques). Le phénomène de dilution des mycobactéries non-tuberculeuses dans les eaux de surface au cours d'événements pluvieux (chapitre III §II.3 / article ⑥) montre que ces événements ne constitueraient pas des sources majeures de mycobactéries non-tuberculeuses. Néanmoins, il semble que ces ruissellements impactent beaucoup plus la densité de mycobactéries non-tuberculeuses dans les zones à proximité des forêts tourbeuses et de marécages (chapitre III §II.2 / article ⑤). Dans le but d'apprécier directement l'apport de ruissellements en temps de pluie et de mieux quantifier les rejets de déversoir d'orage, il pourrait être envisagé d'utiliser des systèmes de piégeage des mycobactéries non-tuberculeuses en captant par exemple la matière organique au cours du temps avec des membranes prévues à cet effet, tout en empêchant la croissance des microorganismes par des systèmes réfrigérants.

En conclusion, alors que la recherche focalise majoritairement ses efforts sur les microorganismes pathogènes d'origine fécale (McCarthy 2008), cette thèse a contribué à améliorer les connaissances d'un microorganisme pathogène d'origine non fécale et émergent, en particulier sa distribution dans les environnements terrestres et aquatiques naturels ou fabriqués par l'Homme. De plus, ces travaux ont contribué à briser certaines barrières entre la microbiologie clinique et environnementale. Effectivement ces domaines de la recherche contemporaine ne cessent de s'accroître (Buchen 2010) et deviennent un enjeu fondamental dans la compréhension des cycles de vie des microorganismes opportunistes dans l'environnement qui leur a permis d'acquérir leurs caractéristiques de virulences (Morris *et al.* 2008).

RÉFÉRENCES

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

- Adékambi, T., P. Berger, D. Raoult et M. Drancourt (2006a). *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(1): 133-143.
- Adékambi, T., P. Colson et M. Drancourt (2003). *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(12): 5699-5708.
- Adékambi, T. et M. Drancourt (2004). 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* **54**(6): 2095-2105.
- Adékambi, T., C. Foucault, B. La Scola et M. Drancourt (2006b). Report of two fatal cases of *Mycobacterium mucogenicum* central nervous system infection in immunocompetent patients. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(3).
- Adékambi, T., D. Raoult et M. Drancourt (2006c). *Mycobacterium barrassiae* sp. nov., a *Mycobacterium moriokaense* group species associated with chronic pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(10): 3493-3498.
- Adékambi, T., M. Reynaud-Gaubert, G. Greub, M. J. Gevaudan, B. La Scola, D. Raoult, et al. (2004). Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(12): 5493-5501.
- Adékambi, T., S. B. Salah, M. Khelif, D. Raoult et M. Drancourt (2006d). Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(9): 5974-5981.
- Adékambi, T., A. Stein, J. Carvajal, D. Raoult et M. Drancourt (2006e). Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(4): 1268-1273.
- Ahmed, W., F. Huygens, A. Goonetilleke et T. Gardner (2008). Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(17): 5490-5496.
- Alavi, M. R., H. D. Shukla, B. Whitaker, J. Arnold et M. Shahamat (2007). Attachment and biofilm formation of *Mycobacterium marinum* on a hydrophobic surface at the air interface. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **23**(1): 293-301.
- Álvarez, J., I. Gómez García, A. Aranaz, J. Bezos, B. Romero, L. de Juan, et al. (2008). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: Molecular characterization for diagnostic purposes. *Journal of Clinical Microbiology* **46**(4): 1246-1251.
- Ambrosio, S. R., E. M. D. Oliveira et C. A. R. Rodriguez (2008). Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**(2): 241-244.
- Anargyros, P., D. S. J. Astill et I. S. L. Lim (1990). Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **28**(6): 1288-1291.
- Angenent, L. T., S. T. Kelley, A. St. Amand, N. R. Pace et M. T. Hernandez (2005). Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(13): 4860-4865.
- Appleyard, G. D. et E. G. Clark (2002). Histologic and genotypic characterization of a novel *Mycobacterium* species found in three cats. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(7): 2425-2430.
- Aranaz, A., D. Cousins, A. Mateos et L. Dominguez (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **53**(6): 1785-1789.
- Araujo, R. M., R. M. Arribas et R. Pares (1991). Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *Journal of Applied Bacteriology* **71**(182-186).
- Aronson, J. D. (1926). Spontaneous tuberculosis in salt water fish. *Journal of Infectious Diseases* **39**(1): 314-320.
- Astagneau, P., N. Desplaces, V. Vincent, V. Chicheportiche, A. Botherel, S. Maugat, et al. (2001). *Mycobacterium xenopi* spinal infections after discovertebral surgery: investigation and screening of a large outbreak. *Lancet* **358**(9283): 747-751.
- Ausina, V., M. Luquin, M. Garcia Barcelo, M. A. Lanéelle, V. Lévy-Frébault, F. Belda, et al. (1992). *Mycobacterium alvei* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(4): 529-535.
- Bang, D., T. Herlin, M. Stegger, A. B. Andersen, P. Torkko, E. Tortoli, et al. (2008). *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(10): 2398-2402.
- Bange, F. C. et E. Böttger (2002). Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **21**(7): 546-548.
- Bange, F. C., P. Kirschner et E. C. Böttger (1999). Recovery of mycobacteria from patients with

- cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(11): 3761-3763.
- Bannalikal, A. S. et R. Verma (2006). Detection of *Mycobacterium avium* & *M. tuberculosis* from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR. *Indian Journal of Medical Research* **123**(1): 165-172.
- Bartmann, K. (1975). Biometrie der mykobakterien. Mycobakterien und mykobakterielle Krankheiten. G. Meissner, A. Schmiedel and A. Nelles Eds. Jena, in *VEB Gustav Fischer*. **III**: 19-58.
- Baulard, A., L. Kremer et C. Locht (1996). Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **178**(11): 3091-3098.
- Behr, M. A. et J. O. Falkinham (2009). Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiology* **4**(8): 1009-1020.
- Ben-Dov, E., O. H. Shapiro, N. Siboni et A. Kushmaro (2006). Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(11): 6902-6906.
- Ben Salah, I., C. Cayrou, D. Raoult et M. Drancourt (2009). *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(11): 2803-2808.
- Bercovier, H., O. Kafri et S. Sela (1986). Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **136**(3): 1136-1141.
- Berekaa, M. M. et A. Steinbüchel (2000). Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisonense*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(10): 4462-4467.
- Bergey, D. H., F. C. Harrison, R. S. Breed, B. W. Hammer et F. M. Huntoon (1923). Bergey's manual of determinative bacteriology. T. W. W. Co Eds. Baltimore, in.
- Biet, F., M. L. Boschiroli, M. F. Thorel et L. A. Guilloteau (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research* **36**(1): 411-436.
- Billen, G., J. Garnier et J. M. Mouchel (2007). Human activity and material fluxes in a regional River Basin: The Seine River watershed. *Science of The Total Environment* **375**(1-3): 1-311.
- Blackwood, K. S., C. He, J. Gunton, C. Y. Turenne, J. Wolfe et A. M. Kabani (2000). Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(8): 2846-2852.
- Bland, C. S., J. M. Ireland, E. Lozano, M. E. Alvarez et T. P. Primm (2005). Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(10): 5719-5727.
- Böddinghaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blocker et E. C. Bottger (1990). Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology* **28**(8): 1751-1759.
- Boettger, E. C. (1997). *Mycobacterium isoniacini* sp. nov. *GenBank (accession X80768)*
- Bojalil, L. F., J. Cerbon et A. Trujillo (1962). Adansonian classification of mycobacteria. *Journal of General Microbiology* **28**(1): 333-346.
- Bolton, F. J., D. Coates, D. N. Hutchinso et A. F. Godfre (1987). A study of thermophilic campylobacters in a river system. *Journal of Applied Bacteriology* **62**(1): 167-176.
- Bonicke, R. et S. E. Juhasz (1964). Beschreibung der neuen species *Mycobacterium vaccae* n. sp. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* **192**(I): 133-135.
- Böttger, E. C., B. Hirschel et M. B. Coyle (1993). *Mycobacterium genavense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(4): 841-843.
- Brezna, B., A. A. Khan et C. E. Cerniglia (2003). Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp. *FEMS Microbiology letters* **223**(2): 177-183.
- Brown, B. A., B. Springer, V. A. Steingrube, R. W. Wilson, G. E. Pfyffer, M. J. Garcia, et al. (1999). *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**(4): 1493-1511.
- Bruijnesteijn van Coppennaet, E. S. (2009). Diagnostics of non-tuberculous mycobacteria Eds. Leiden, in *Universiteit Leiden*: 155.
- Brunello, F., F. Favari et R. Fontana (1999). Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(4): 1206-1209.
- Buchen, L. (2010). The new germ theory. *Nature* **468**(1): 492-495.
- Buijtelts, P. C. A. M. et P. L. C. Petit (2005). Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Microbiological Methods* **62**(1): 83-88.
- Bull, T. J., D. C. Shanson et L. C. Archard (1995). Rapid identification of mycobacteria from AIDS patients by capillary electrophoretic profiling of amplified SOD gene. *Clinical Molecular Pathology* **48**(3): M124-M132.
- Butler, W. R., D. G. Ahearn et J. O. Kilburn (1986). High-Performance Liquid Chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* **21**(1): 182-185.

- Butler, W. R., K. C. Jost et J. O. Kilburn (1991). Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* **29**(11): 2468-2472.
- Butler, W. R. et J. O. Kilburn (1990). High-performance liquid chromatography patterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Clinical Microbiology* **28**(9): 2094-2098.
- Butler, W. R., S. P. O'Connor, M. A. Yakrus, R. W. Smithwick, B. B. Plikaytis, C. W. Moss, et al. (1993). *Mycobacterium celatum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(3): 539-548.
- Butler, W. R., L. Thibert et J. O. Kilburn (1992). Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* **30**(10): 2698-2704.
- Cage, G. D. (1992). High-performance liquid chromatography patterns of *Mycobacterium gordonae* mycolic acids. *Journal of Clinical Microbiology* **30**(9): 2402-2407.
- Cage, G. D. (1994). Direct identification of *Mycobacterium* species in BACTEC 7H12B medium by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* **32**(2): 521-524.
- Cai, L., X. Chen, T. Zhao, B. C. Ding et J. Z. Zhang (2006). 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* **119**(1): 43-48.
- Cangelosi, G., C. O. Palermo et L. E. Bermudez (2001). Phenotypic consequences of red-white colony type in *Mycobacterium avium*. *Microbiology* **147**(1): 527-533.
- Carbonnelle, B., B. Thorel, A. L. Manceau, B. Foui et E. Carpentier (1996). Nouvelle technique de détection des mycobactéries: Utilisation de l'automate Bactec 9240 TB *Revue Française des Laboratoires* **1**(282): 125-128.
- Carson, L. A., L. B. Cusick, L. A. Bland et M. S. Favero (1988). Efficacy of chemical dosing methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(7): 1756-1760.
- Caruso, G., F. M. Passàli, L. Salerni, G. Molinaro et M. Messina (2009). Head and neck mycobacterial infections in pediatric patients. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* **73**(1): 38-41.
- Casal, M. et J. R. Calero (1974). *Mycobacterium gadium* sp. nov. A new species of rapid-growing scotochromogenic mycobacteria. *Tubercle and Lung Disease* **55**(4): 299-308.
- Cassette, C. T. et M. Sanchez (2004). *Mycobacterium marinum* infection. *Dermatology Online Journal* **10**(3): 21.
- Castignolles, N., F. Petit, I. Mendel, L. Simon, L. Cattolico et C. Buffet-Janvresse (1998). Detection of Adenovirus in the waters of the Seine River estuary by nested-PCR. *Molecular and Cellular Probes* **12**(1): 175-180.
- Chai, N., L. Deforges, W. Sougakoff, C. Truffot-Pernot, A. De Luze, b. Demeneix, et al. (2006). *Mycobacterium szulgai* infection in a captive population of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **37**(1): 55-58.
- Chamoiseau, G. (1973). *M. farcinogenes* agent causal du farcin du bœuf en Afrique. *Annales de Microbiologie de l'Institut Pasteur (Paris)* **124**(A): 215-222.
- Chang, C. T., L. Y. Wang, C. Y. Liao et S. P. Huang (2002). Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(6): 3159-3161.
- Che, D. (2008). Les cas de tuberculose maladie déclarés en France en 2006. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* **10**(11): 69-76.
- Cheunoy, W., T. Prammanananb, A. Chairprasert et S. Foongladda (2005). 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* **51**(1): 165-171.
- Chilima, B. Z., I. M. Clark, S. Floyd, P. E. Fine et P. R. Hirsch (2006). Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(4): 2343-2350.
- Cirillo, J. D., S. Falkow, L. S. Tompkins et L. E. Bermudez (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection and Immunity* **65**(9): 3759-3767.
- Clark-Curtiss, J. E. (1990). Genome structure of mycobacteria. J. McFadden Eds. London, in *Academic Press*: 77-98.
- Cloud, J. L., J. J. Meyer, J. I. Pounder, K. C. Jost, A. Sweeney, K. C. Carroll, et al. (2006). *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(6): 1413-1418.
- Cloud, J. L., H. Neal, R. Rosenberry, C. Y. Turenne, M. Jama, D. R. Hillyard, et al. (2002). Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(2): 400-406.
- Cole, S. T., Brosch, R., J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, et al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* for the complete genome sequence. *Nature Australia* **44**(6685): 393-537.
- Collins, M. T., K. B. Kenefick, D. C. Sockett, R. S. Lambrecht, J. McDonald et J. B. Jorgensen (1990).

- Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **28**(11): 2514-2519.
- Conville, P. S., J. W. Andrews et F. G. Witebsky (1995). Effect of PANTA on growth of *Mycobacterium kansasii* in BACTEC 12B medium. *Journal of Clinical Microbiology* **33**(8): 2012-2013.
- Cook, V. J., C. Y. Turenne, J. Wolfe, R. Pauls et A. Kabani (2003). Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: Cost analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(3): 1010-1015.
- Cooksey, R. C., J. H. de Waard, M. A. Yakrus, I. Rivera, M. Chopite, S. R. Toney, et al. (2004). *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(6): 2385-2391.
- Corbett, E. L., L. Blumberg, G. J. Churchyard, N. Moloi, K. Mallory, T. Clayton, et al. (1999). Nontuberculous mycobacteria: Defining disease in a prospective cohort of South African miners. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **160**(1): 15-21.
- Cousins, D. V., R. Bastida, A. Cataldi, V. Quise, S. Redrobe, S. Dow, et al. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(5): 1305-1314.
- Covert, T. C., M. R. Rodgers, A. L. Reyes et G. N. Stelma (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6): 2492-2496.
- Cuttino, J. T. et A. M. McCabe (1949). Pure granulomatous nocardiosis: A new fungus disease distinguished by intracellular parasitism. *American Journal of Clinical Pathology* **25**(1): 1-34.
- Da Costa Cruz, J. C. (1938). *Mycobacterium fortuitum* um novo bacillo acidoresistance patogenico para o homem. *Acta Medica (Rio de Janeiro)* **1**(1): 297-301.
- Dailloux, M., M. Albert, C. Laurain, S. Andolfatto, A. Lozniewski, P. Hartemann, et al. (2003). *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6946-6948.
- Dailloux, M., C. Laurain, M. Weber et P. Hartemann (1999). Water and nontuberculous mycobacteria. *Water Research* **33**(10): 2219-2228.
- Dauendorffer, J. N., I. Guillemin, A. Aubry, C. Truffot-Pernot, W. Sougakoff, V. Jarlier, et al. (2003). Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(3): 1311-1315.
- Davies, C. M., V. G. Mitchell, S. M. Petterson, G. D. Taylor, J. Lewis, C. Kaucner, et al. (2008). Microbial challenge-testing of treatment processes for quantifying stormwater recycling risks and management. *Water Science & Technology* **57**(6): 843-847.
- Davis, J. B., H. H. Chase et R. L. Raymond (1956). *Mycobacterium paraffinicum* n. sp., a bacterium isolated from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **4**(6): 310-315.
- de Juan, L., J. Alvarez, B. Romero, J. Bezos, E. Castellanos, A. Aranaz, et al. (2006). 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* **72**(9): 5927-5932.
- del Rio Camacho, G., L. Soriano Guillén, J. Flandes Aldeyturriaga, B. Hernández García et M. Bernácer Borja (2010). Endobronchial atypical mycobacteria in an immunocompetent child. *Pediatric Pulmonology* **45**(5): 511-513.
- Denis, F. et C. Perronne (2004). *Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques. J. C. Nicolas Eds. Paris, in Elsevier SAS: 1-288.
- Derz, K., U. Klinner, I. Schphan, E. Stackebrandt et R. M. Kroppenstedt (2004). *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(6): 2313-2317.
- Dobner, P., K. Feldmann, M. Rifai, T. Loscher et H. Rinder (1996). Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(4): 866-869.
- Domenech, P., M. S. Jimenez, M. C. Menendez, T. J. Bull, S. Samper, A. Manrique, et al. (1997). *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(2): 535-540.
- Domenech, P., M. C. Menendez et M. J. Garcia (1994). Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiology letters* **116**(1): 19-24.
- Donaghy, J. A., N. L. Totton et M. T. Rowe (2003). Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology* **37**(4): 285-291.
- Doucet-Populaire, F., V. Lalandeb, E. Carpentierc, A. Bourgoind, M. Dailloux, C. Bolletf, et al. (1996). A blind study of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Tubercle and Lung Disease* **77**(4): 358-362.
- Drancourt, M., V. Jarlier et D. Raoult (2002). The environmental pathogen *Mycobacterium ulcerans* grows in amphibian cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(12): 6403-6404.
- Duffey, P. S. et L. S. Guthertz (1992). *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*

- chromatotypes defined by curvilinear gradient HPLC of mycolic acids. *FEMS Microbiology Letters* **95**(1): 27-36.
- Duffey, P. S., L. S. Guthertz et G. C. Evans (1996). Improved rapid detection of mycobacteria by combining solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(8): 1939-1943.
- Dutil, S., M. Veillette, A. Mériaux, L. Lazure, J. Barbeau et C. Duchaine (2007). Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: Low exposure despite dental unit contamination. *Environmental Microbiology* **9**(11): 2836-2843.
- Eckburg, P. B., E. O. Buadu, P. Stark, P. S. Sarinas, R. K. Chitkara et W. G. Kuschner (2000). Clinical and chest radiographic findings among persons with sputum culture positive for *Mycobacterium gordonae*: A review of 19 cases. *Chest* **117**(1): 96-102.
- Euzéby, J. P. (2010). Techniques de diagnostics en mycobactériologie. *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire* <http://www.mycobacterie.fr>.
- Even, S., J. M. Mouchel, P. Servais, N. Flipo, M. Poulin, S. Blanc, et al. (2007). Modelling the impacts of combined sewer overflows on the river Seine water quality. *Science of The Total Environment* **375**(1-3): 140-151.
- Ezold, R., D. Sandow, R. Neubert et H. E. Stein (1968). 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* **129**(3): 157-166.
- Falkinham, J. O. (2003a). The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Canadian Journal of Infectious Diseases* **14**(5): 281-286.
- Falkinham, J. O. (2003b). Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases* **9**(7): 763-7.
- Falkinham, J. O. (2004). Environmental sources of *Mycobacterium avium* linked to routes of exposure. Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public health consequences, monitoring and management. S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour and J. Cotruvo Eds. London, in *World Health Organization titles with IWA Publishing*. **1**: 26-38.
- Falkinham, J. O. (2009). Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology* **107**(2): 356-367.
- Falkinham, J. O., G. Nichols, J. Bartram, A. Dufour et F. Portaels (2004). Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance. Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public health consequences, monitoring and management. S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour and J. Cotruvo Eds. London, in *World Health Organization titles with IWA Publishing*. **1**: 15-25.
- Falkinham, J. O., C. D. Norton et M. W. LeChevallier (2001). Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(3): 1225-1231.
- Fanti, F., E. Tortoli, L. Hall, G. D. Roberts, R. M. Kroppenstedt, I. Dodi, et al. (2004). *Mycobacterium parmense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(4): 1123-1127.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**(4): 783-791.
- Felske, A., H. Rheims, A. Wolterink, E. Stackebrandt et A. D. L. Akkermans (1997). Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology* **143**(1): 2983-2989.
- Flageul, B. (2009). Situation et surveillance de la lèpre dans le monde, en France métropolitaine et d'outre-mer. *Institut de Veille Sanitaire, Département International and Tropical*: 1-8.
- Floyd, M. M., L. S. Guthertz, V. A. Silcox, P. S. Duffey, Y. Jang, E. P. Desmond, et al. (1996). Characterization of an SAV organism and proposal of *Mycobacterium triplex* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(12): 2963-2967.
- Fogel, G. B., C. R. Collins, J. Li et C. F. Brunk (1999). Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology* **38**(2): 93-113.
- Fréhel, C., C. de Chastellier et T. Lang (1986). Evidence for inhibition of fusion of the lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infection and Immunity* **52**(1): 252-262.
- Frostegård, A., S. Courtois, V. Ramière, S. Clerc, D. Bernillon, F. Le Gall, et al. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12): 5409-5420.
- Fukushima, M., K. Kakinuma, H. Hayashi, H. Nagai, K. Ito et R. Kawaguchi (2003). Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(6): 2605-15.
- Fumagalli, L., C. Jan Cabrita et V. Castella (2009). Simultaneous identification of multiple mammalian species from mixed forensic samples based on mtDNA control region length polymorphism. *Forensic Science International: Genetics Supplementary Series* **2**(1): 302-303.
- Gangadharam, P. R. J. et P. A. Jenkins (1998a). Mycobacteria, basic aspects Eds. New York, in *International Thomson Publishing*. **1**: 400.
- Gangadharam, P. R. J. et P. A. Jenkins (1998b). Mycobacteria, chemotherapy Eds. New York, in *International Thomson Publishing*. **2**: 436.
- García-Quintanilla, A., J. González-Martín, G. Tundo, M. Espasa et M. T. Jiménez de Anta (2002).

- Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(12): 4646-4651.
- Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, *et al.* (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(13): 7877-7882.
- George, K. L. et J. O. Falkinham (1989). Aerosolization of mycobacteria. *Aerobiology, Health, Environment* **1**(1): 211-220.
- Gill, W. P., N. S. Harik, M. R. Whiddon, R. P. Liao, J. E. Mittler et D. R. Sherman (2009). A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine* **15**(2): 211-214.
- Gira, A., A. H. Reisenauer, L. Hammock, U. Nadiminti, J. T. Macy, A. Reeves, *et al.* (2004). Furunculosis due to *Mycobacterium mageritense* associated with footbaths at a nail salon. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(4): 1813-1817.
- Gomila, M., A. Ramirez, J. Gascó et J. Lalucat (2008). *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(12): 2769-2773.
- Gomila, M., A. Ramirez et J. Lalucat (2007). Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(12): 3787-3797.
- Goni-Urriza, M., M. Capdepuy, C. Arpin, N. Raymond, P. Caumette et C. Quentin (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(1): 125-132.
- Gonzalez-y-Merchand, J. A., M. J. Garcia, S. Gonzalez-Rico, M. J. Colston et R. A. Cox (1997). Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *Journal of Bacteriology* **179**(22): 6949-6958.
- Goodfellow, M. et J. Magee (1998). Taxonomy of mycobacteria. Mycobacteria basic aspects. P. R. J. Gangadharam and P. A. Jenkins Eds. New York and London, in *Chapman and Hall*. **2**: 1-71.
- Goren, M. B. (1972). Mycobacterial lipids: Selected topics. *Bacteriological Reviews* **36**(1): 33-64.
- Griffith, J. F., Y. Cao, C. D. McGee et S. B. Weisberg (2009). Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. *Water Research* **43**(19): 4900-4907.
- Gromaire, M. C., M. Kafi, J. Gasperi, M. Saad, R. Moilleron et G. Chebbo (2008). Settling velocity of particulate pollutants from combined sewer wet weather discharges. *Water Science and Technology* **58**(12): 2453-2465.
- Guillemin, I., E. Cambau et V. Jarlier (1995). Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium* : Phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**(9): 2145-2149.
- Guthertz, L. S., S. D. Lim, Y. Jang et P. S. Duffey (1993). Curvilinear-gradient high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(7): 1876-1881.
- Haas, W. H., W. R. Butler, P. Kirschner, B. B. Plikaytis, M. B. Coyle, B. Amthor, *et al.* (1997). A new agent of mycobacterial lymphadenitis in children: *Mycobacterium heidelbergense* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* **35**(12): 3203-3209.
- Hägglblom, M. M., L. J. Nohynek, N. J. Palleroni, K. Kronqvist, E. L. Nurmiäho-Lassila, M. S. Salkinoja-Salonen, *et al.* (1994). Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti *et al.* 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**(3): 485-493.
- Hansen, G. A. (1880). *Bacillus leprae*. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin* **79**(1): 32-42.
- Hansen, J. S. et J. E. Ongerth (1991). Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(10): 2790-2795.
- Harmsen, D., S. Dostal, A. Roth, S. Niemann, J. Rothgänger, M. Sammeth, *et al.* (2003). RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infectious Diseases* **3**(26): 1-10.
- Hauduroy, P. (1955). Derniers aspects du monde des mycobactéries. Eds. Paris, in *Masson et Cie*.
- Heckert, R. A., S. Elankumaran, A. Milani et A. Baya (2001). Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(2): 710-715.
- Heinz-Taheny, K. M. (2009). Cardiovascular physiology and diseases of amphibians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **12**(1): 39-50.
- Hennessee, C. T., J. S. Seo, A. M. Alvarez et Q. X. Li (2009). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(2): 378-387.
- Hilborn, E. D., T. C. Covert, M. A. Yakrus, S. I. Harris, S. F. Donnelly, E. W. Rice, *et al.* (2006). Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(9): 5864-5869.

- Hoop, R. K., E. C. Böttger et G. E. Pfyffer (1996). Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(4): 991-992.
- Hopewell, P. C. et B. R. Bloom (2000). Tuberculosis and other mycobacterial diseases. Respiratory medicine J. F. Murray and J. A. Nadel Eds. Philadelphia, in *Saunders Company*.
- Hormisch, D., I. Brost, G. W. Kohring, F. Giffhorn, R. M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt, et al. (2004). *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **27**(6): 653-660.
- Hunter, P. R. et M. A. Gaston (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26**(1): 2465-2466.
- Iivanainen, E. K., P. J. Martikainen, P. K. Vaananen et M. L. Katila (1993). Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(2): 398-404.
- Inderlied, C. B., C. A. Kemper et L. M. Bermudez (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews* **6**(3): 266-310.
- Jeyanathan, M., D. C. Alexander, C. Y. Turenne, C. Girard et M. A. Behr (2006). Evaluation of in situ methods used to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in samples from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(8): 2942-2950.
- Jiang, S., R. Noble et W. Chu (2001). Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(1): 179-184.
- Jiménez, M. S., M. I. Campos-Herrero, D. Garcia, M. Luquin, L. Herrera et M. J. Garcia (2004). *Mycobacterium canariasense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5): 1729-1734.
- Jordaõ Junior, C. M., F. C. M. Lopes, S. David, A. Farache Filho et C. Q. F. Leite (2009). Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiology* **26**(6): 658-661.
- Jukes, T. H. et C. R. Cantor (1969). Evolution of protein molecules. In mammalian protein metabolism. A. Press Eds. New York, in *Munro, H.N.*: 21-132.
- Jussila, J., H. Komulainen, K. Huttunen, M. Roponen, E. Iivanainen, P. Torkko, et al. (2002). *Mycobacterium terrae* isolated from indoor air of a moisture-damaged building induces sustained biphasic inflammatory response in mouse lungs. *Environmental Health Perspectives* **110**(11): 1119-1125.
- Kaal, E., A. H. J. Kolk et H. G. Janssen (2009). A fast method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**(35): 6319-6325.
- Kahana, L. M. et J. M. Kay (1997). Pneumonitis due to *Mycobacterium avium* complex in hot tub water: Infection or hypersensitivity. *Chest* **112**(6): 1713-1714.
- Kahana, L. M., J. M. Kay, M. A. Yakrus et S. Wasserman (1997). *Mycobacterium avium* complex infection in an immunocompetent young adult related to hot tub exposure. *Chest* **111**(1): 242-245.
- Kamala, T., C. N. Paramasivan, D. Herbert, P. Venkatesan et R. Prabhakar (1994). Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(3): 1021-1024.
- Karlson, A. G. et E. F. Lessel (1970). *Mycobacterium bovis* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **20**(3): 273-282.
- Karssova, V., J. Weiszfeiler et E. Krasznay (1965). Occurrence of atypical mycobacteria in *Macacus rhesus*. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **12**(1): 275-282.
- Kazda, J. (1980). *Mycobacterium sphagni* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**(1): 77-81.
- Kazda, J. (2000). The ecology of mycobacteria. J. Kazda Eds. Dordrecht, Boston, London, in *Kluwer Academic Publishers*. **1**: 72.
- Kazda, J. (2009). The chronology of mycobacteria and the development of mycobacterial ecology. The ecology of mycobacteria: Impact on animal's and human's health. J. Kazda, I. Pavlik, J. O. Falkinham and K. Hruska Eds. Dordrecht Heidelberg London New York, in *Springer*. **1**: 1-11.
- Kazda, J., R. Cooney, M. Monaghan, P. J. Quinn, E. Stackebrandt, M. Dorsch, et al. (1993). *Mycobacterium hiberniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(2): 352-357.
- Kazda, J., H. J. Müller, E. Stackebrandt, M. Daffe, K. Müller et C. Pitulle (1992). *Mycobacterium madagascariense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(4): 524-528.
- Kazda, J. et K. Muller (1979). *Mycobacterium komossense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **29**(4): 361-365.
- Kazda, J. et I. Pavlik (2009). Obligatoire mycobacteria. The ecology of mycobacteria: Impact on animal's and human's health. J. Kazda, I. Pavlik, J. O. Falkinham and K. Hruska Eds. Dordrecht Heidelberg London New York, in *Springer*. **1**: 13-19.
- Kazda, J., E. Stackebrandt, J. Smida, D. E. Minnikin, M. Daffe, J. H. Parlett, et al. (1990). *Mycobacterium cookii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**(3): 217-223.
- Kempell, K. E., Y. E. Ji, I. C. E. Estrada, M. J. Colston et R. A. Cox (1992). The nucleotide sequence of the promoter, 16S rRNA and spacer

- region of the ribosomal RNA operon of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with *Mycobacterium leprae* precursor rRNA. *Journal of General Microbiology* **138**(8): 1717-1727.
- Kendall, S. L., P. Burgess, R. Balhana, M. Withers, A. ten Bokum, J. S. Lott, *et al.* (2010). Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: *kstR* and *kstR2*. *Microbiology* **156**(1): 1362-1371.
- Kendall, S. L., M. Withers, C. N. Soffair, N. J. Moreland, S. Gurcha, B. Sidders, *et al.* (2007). A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **65**(3): 684-699.
- Khan, A. A., S. J. Kim, D. D. Paine et C. E. Cerniglia (2002). Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6): 1997-2002.
- Khare, S., T. A. Ficht, R. L. Santos, J. Romano, A. R. Ficht, S. Zhang, *et al.* (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(3): 1075-1081.
- Khoor, A., K. O. Leslie, H. D. Tazelaar, R. A. Helmers et T. V. Colby (2001). Diffuse pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in immunocompetent people (hot tub lung). *American Journal of Clinical Pathology* **115**(5): 755-762.
- Kim, B. J., S. K. Hong, K. H. Lee, Y. J. Yun, E. C. Kim, Y. G. Park, *et al.* (2004). Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology* **42**(3): 1308-1312.
- Kim, B. J., S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bai, S. J. Kim, *et al.* (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology* **37**(6): 1714-1720.
- Kim, H. K. et J. H. Yur (2004). Effects of the non-point source pollution on the concentration of pathogen indicator organisms in the geum river basin, Republic of Korea. *KSCE Journal of Civil Engineering* **8**(2): 181-187.
- Kim, H. Y., Y. J. Yun, C. G. Park, D. H. Lee, Y. K. Cho, B. J. Park, *et al.* (2007). Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(9): 3127-3130.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Kirsch, P., P. Nusser, H. Hotzel et I. Moser (2008). *Mycobacterium gordonae* as potential cause of granulomatous lesions of the toe tips in the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* **121**(7-8): 270-277.
- Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, A. Meier, A. Wrede, M. Kiekenbeck, *et al.* (1993). Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(11): 2882-2889.
- Kirschner, P., A. Teske, K. H. Schröder, R. M. Kroppenstedt, J. Wolters et E. C. Böttger (1992). *Mycobacterium confluentis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(2): 257-262.
- Kirschner, R. A., B. C. Parker et J. O. Falkinham (1999). Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiology Ecology* **30**(4): 327-332.
- Klappenbach, J. A., P. R. Saxman, J. R. Cole et T. M. Schmidt (2001). *rrndb*: The ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research* **29**(1): 181-184.
- Kleespies, M., R. M. Kroppenstedt, F. A. Rainey, L. E. Webb et E. Stackebrandt (1996). *Mycobacterium hodleri* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(3): 683-687.
- Koukila-Kähkölä, P., B. Springer, E. C. Böttger, L. Paulin, E. Jantzen et M. L. Katila (1995). *Mycobacterium branderi* sp. nov., a new potential human pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**(3): 549-553.
- Kox, L. F. F., J. van Leeuwen, S. Knijper, H. M. Jansen et A. H. J. Kolk (1995). PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* **33**(12): 3225-3233.
- Krometis, L. A. H., G. W. Characklis, O. D. Simmons III, M. J. Dilts, C. A. Likirdopulos et M. D. Sobsey (2007). Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. *Water Research* **41**(2): 506-516.
- Kubica, G. P., A. J. Kaufmann et W. E. Dye (1964). Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *American Review of Respiratory Diseases* **87**(1): 775-779.
- Kubica, G. P., V. A. Silcox, J. O. Kilburn, R. W. Smithwick, R. E. Beam, W. D. Jones, *et al.* (1970). Differential identification of mycobacteria. VI. *Mycobacterium triviale* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **20**(2): 161-174.
- Kunst, H., M. Wickremasinghe, A. Wells et R. Wilson (2006). Nontuberculous mycobacterial disease and *Aspergillus*-related lung disease in bronchiectasis. *European Respiratory Journal* **28**(1): 352-357.

- Kusunoki, S. et T. Ezaki (1992). Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica *et al.*) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(2): 240-245.
- Lagunas-Solar, M. C., J. S. Cullor, N. X. Zeng, T. D. Truong, T. K. Essert, W. L. Smith, *et al.* (2005). Disinfection of dairy and animal farm wastewater with radiofrequency power. *Journal of Dairy Science* **88**(1): 4120-4131.
- Lamy, B., H. Marchandin, K. Hamitouche et F. Laurent (2008). *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* **58**(2): 486-490.
- Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou et V. Vincent (2002a). Chlorine disinfection of atypical *Mycobacteria* isolated from a water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(3): 1025-1032.
- Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou et V. Vincent (2002b). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5318-5325.
- Lee, H., S. A. Lee, I. K. Lee, H. K. Yu, Y. G. Park, J. Jeong, *et al.* (2010a). *Mycobacterium paraterrae* sp. nov. recovered from a clinical specimen: Novel chromogenic slow growing mycobacteria related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiology and Immunology* **54**(1): 46-53.
- Lee, H. K., S. A. Lee, I. K. Lee, H. K. Yu, Y. G. Park, J. W. Hyun, *et al.* (2010b). *Mycobacterium paraseoulense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species related genetically to *Mycobacterium seoulense*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(2): 439-443.
- Lefmann, M., B. Schweickert, P. Buchholz, U. B. Gobel, T. Ulrichs, P. Seiler, *et al.* (2006). Evaluation of peptide nucleic acid-Fluorescence In Situ Hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(1): 3760-3767.
- Légrand, E., C. Sola et N. Rastogi (1999). Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* : Marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission interspèces. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* **93**(3): 155-217.
- Lehmann, K. B. et R. O. Neuman (1899a). Bakteriologische diagnostik. Verlg. L. F. Lehmanns Eds. München, in. **2 Aulf**: 408-413.
- Lehmann, K. B. et R. O. Neuman (1899b). Lehmann's medizin, handatlanter X. J. Lehmann Eds. München, in. **2 Aulf**.
- Lehtinen, V. A., T. Kaukonen, I. Ikäheimo, S. M. Mähönen, M. Koskela et P. Ylipalosaari (2005). *Mycobacterium fortuitum* infection after a brown bear bite. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(2): 1009.
- Lehtola, M. J., Eila Torvinen, I. T. Miettinen et W. Keevil (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. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(1): 848-853.
- Leite, C. Q. F., C. Souza et S. R. d. A. Leite (1998). Identification of mycobacteria by Thin Layer Chromatographic Analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: Four years of experience. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **93**(6): 801-805.
- Leitritz, L., S. Schubert, B. Bücherl, A. Masch, J. Heesemann et A. Roggenkamp (2001). 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* **39**(10): 3764-3767.
- Levi, M. H., J. Bartell, L. Gandolfo, S. C. Smole, S. F. Costa, L. M. Weiss, *et al.* (2003). Characterization of *Mycobacterium montefiorensis* sp. nov., a novel pathogenic mycobacterium from moray eels that is related to *Mycobacterium triplex*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(5): 2147-2152.
- Lévy-Frébault, V., É. Rafidinarivo, J. C. Promé, J. Grandry, H. Boisvert et H. L. David (1983). *Mycobacterium fallax* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(2): 336-343.
- Leys, N. M., A. Ryngaert, L. Bastiaens, P. Wattiau, E. M. Top, W. Verstraete, *et al.* (2005). Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* **51**(3): 375-388.
- Li, L., J. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. May, D. Alt, *et al.* (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(35): 12344-12349.
- Lindeboom, J. A., J. M. Prins, S. Bruijnesteijn van Coppenraet, R. Lindeboom et E. J. Kuijper (2005). Cervicofacial lymphadenitis in children caused by *Mycobacterium haemophilum*. *Clinical Infectious Diseases* **41**(1): 1569-1575.
- Lucy, F. E., T. K. Graczyk, L. Tamang, A. Miraflor et D. Minchin (2008). Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitology Research* **103**(6): 1369-1375.
- Lumb, R., R. Stapledon, A. Scroop, P. Bond, D. Cunliffe, A. Goodwin, *et al.* (2004). Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in

- immunocompetent adults. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(8): 4906-4910.
- Luquin, M., V. Ausina, V. Lévy-Frèbault, M. A. Lanéelle, F. Belda, M. Garcia-Barcelo, *et al.* (1993). *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(3): 405-413.
- Lyautey, E., D. R. Lapen, G. Wilkes, K. McCleary, F. Pagotto, K. Tyler, *et al.* (2007). Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the south Nation River watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(17): 5401-5410.
- MacCallum, P., J. C. Tolhurst et G. Buckle (1950). The significance of the incubation period in infectious diseases. F. Fenner Eds, in. **2**: 813-818.
- Marcela Rodriguez, G. et I. Smith (2003). Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: Role in physiology and virulence. *Molecular Microbiology* **47**(6): 1485-1494.
- Marchoux, E. et F. Sorel (1912). Recherches sur la lèpre. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **26**(1): 675-700.
- Marciano-Cabral, F., M. Jamerson et E. S. Kaneshiro (2010). Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal water utility in the USA. *Journal of Water and Health* **8**(1): 71-82.
- Marks, J., P. A. Jenkins et M. Tsukamura (1972). *Mycobacterium szulgai* - a new pathogen. *Tubercle and Lung Disease* **53**(3): 210-214.
- Marras, T. K., R. J. Wallace, L. L. Koth, M. S. Stulbarg, C. T. Cowl et C. L. Daley (2005). Hypersensitivity pneumonitis reaction to *Mycobacterium avium* in household water. *Chest* **127**(2): 664-671.
- Marri, P. R., J. P. Bannantine et G. B. Golding (2006). Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiology Reviews* **30**(6): 906-925.
- Marsollier, L., R. Robert, J. Aubry, J. P. St. André, H. Kouakou, P. Legras, *et al.* (2002). Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(9): 4623-4628.
- Marsollier, L., T. Séverin, J. Aubry, R. W. Merritt, J. P. St. André, P. Legras, *et al.* (2004a). Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(10): 6296-6298.
- Marsollier, L., T. Stinear, J. Aubry, J. P. St. André, R. Robert, P. Legras, *et al.* (2004b). Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(2): 1097-1103.
- Masaki, T., K. Ohkusu, H. Hata, N. Fujiwara, H. Iihara, M. Yamada-Noda, *et al.* (2006). *Mycobacterium kumamotonense* sp. nov. recovered from clinical specimen and the first isolation report of *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel slowly growing, nonchromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiology and Immunology* **50**(11): 889-897.
- Maslow, J. N. et R. Wallace (2002). Outbreak of *Mycobacterium marinum* infection among captive snakes and bullfrogs. *Zoo Biology* **21**(3): 233-241.
- Maugein, J. et R. Bauriaud (2009). Recensement des mycobactérioses entre 2006 et 2008 par le réseau Azay mycobactéries. 11ème journée de mycobactériologie de langue française. Cbw. Bandol (France).
- McCarthy, D. (2008). PhD thesis: Modelling microorganisms in urban stormwater. Eds. Melbourne, in *Monash University*: 1-462.
- McLellan, S. L. (2004). Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(8): 4658-4665.
- McNabb, A., D. Eisler, K. Adie, M. Amos, M. Rodrigues, G. Stephens, *et al.* (2004). 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* **42**(7): 3000-3011.
- Mediel, M. J., V. Rodriguez, G. Codina et N. Martin-Casabona (2000). Isolation of mycobacteria from frozen fish destined for human consumption. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8): 3637-3638.
- Meier, A., P. Kirschner, K. H. Schröder, J. Wolters, R. M. Kroppenstedt et E. C. Böttger (1993). *Mycobacterium intermedium* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(2): 204-209.
- Mendum, T. A., B. Z. Chilima et P. R. Hirsch (2000). The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. *FEMS Microbiology letters* **185**(2): 189-192.
- Menendez, M. C., M. J. Garcia, M. C. Navarro, J. A. Gonzalez-y-Merchand, S. Rivera-Gutierrez, L. Garcia-Sanchez, *et al.* (2002). Characterization of an rRNA operon (*rrnB*) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species: Implications for the classification of mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **184**(4): 1078-1088.
- Meybeck, A., C. Fortin, S. Abgrall, H. Adle-Biassette, G. Hayem, R. Ruimy, *et al.* (2005). Spondylitis due to *Mycobacterium xenopi* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient: Case report and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(3): 1465-1466.
- Meybeck, M., G. De Marsily et É. Fustec (1998). La Seine en son bassin : fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé. Elsevier Eds. Paris, in.
- Mijs, W., P. de Haas, R. Rossau, T. van der Laan, L. Rigouts, F. Portaels, *et al.* (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp.

- hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(5): 1505-1518.
- Mills, D. K., K. Fitzgerald, C. D. Litchfield et P. M. Gillevet (2003). A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Journal of Microbiological Methods* **54**(1): 57-74.
- Miltner, E. C. et L. E. Bermudez (2000). *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(7): 1990-1994.
- Minnikin, D. E. (1982). Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. C. Ratledge and J. L. Stanford Eds. London, in *Academic Press*. **1**: 95-184.
- Minnikin, D. E., O. Y. C. Lee, M. Pitts, M. S. Baird et G. S. Besra (2010). Essentials in the use of mycolic acid biomarkers for tuberculosis detection: response to "High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection". *Journal of Archeological Science* **37**(10): 2407-2412.
- Mitchison, A. et V. R. Aber (1974). Culture of specimens other than sputum for Mycobacteria. *Journal of Clinical Pathology* **27**(11): 883-887.
- Mohamed, A. M., G. A. Abou El-Ella et E. A. Nasr (2009). Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **21**(1): 48-52.
- Mohamed, A. M., P. C. Iwen, S. Tarantolo et S. H. Hinrichs (2004). *Mycobacterium nebraskense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(6): 2057-2060.
- Mokaddas, E. et S. Ahmad (2007). 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* **60**(1): 140-144.
- Mons, C., A. Dumètre, S. Gosselin, C. Galliot et L. Moulin (2009). Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Research* **43**(1): 211-217.
- Moore, M. et J. B. Frerichs (1953). An unusual acid-fast infection of the knee, with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region. *Journal of Investigative Dermatology* **20**(2): 133-169.
- Morris, C. E., D. C. Sands, B. A. Vinatzer, C. Glaux, C. Guilbaud, A. Buffière, et al. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The International Society for Microbial Ecology Journal* **2**: 321-334.
- Moulin, L., F. Richard, S. Stefania, M. Goulet, S. Gosselin, A. Gonçalves, et al. (2010). Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. *Water Research* **44**(18): 5222-5231.
- Mueller-Ortiz, S. L., A. R. Wanger et S. J. Norris (2001). Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3. *Infection and Immunity* **69**(12): 7501-7511.
- Mun, H. S., H. J. Kim, E. J. Oh, H. Kim, G. H. Bai, H. K. Yu, et al. (2007). *Mycobacterium seoulense* sp. nov., a slowly growing scotochromogenic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(3): 594-599.
- Mun, H. S., J. H. Park, H. Kim, H. K. Yu, Y. G. Park, C. Y. Cha, et al. (2008). *Mycobacterium sensuense* sp. nov., a slowly growing, non-chromogenic species closely related to the *Mycobacterium terrae* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(3): 641-646.
- Murcia, M. I., E. Tortoli, M. C. Menendez, E. Palenque et M. J. Garcia (2006). *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(9): 2049-2054.
- Murray, R. G. E., D. J. Brenner, M. P. Bryant, J. G. Holt, N. R. Krieg, J. W. Mouldier, et al. (1989). Bergey's manual of systematic and bacteriology. J. P. Butler, V. M. Vaughn, C. S. Nollely et al Eds. Baltimore, USA, in *Williams and Wilkins*. **2**: 1599.
- Muyer, G., E. C. de Waal et A. G. Uitterlinden (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3): 695-700.
- Narasimhan, R., G. P. Mathur et S. P. Pamra (1972). Sodium lauryl sulphate method of culturing sputum for *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian Journal of Tuberculosis* **XIX**(4).
- Nascimento, M. M., J. A. Lemos, J. Abranches, V. K. Lin et R. A. Burne (2008). Role of *relA* of *Streptococcus mutans* in global control of gene expression. *Journal of Bacteriology* **190**(1): 28-36.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics and Molecular Biology* **89**(1): 583-590.
- Neuberger, A., H. Sprecher et I. Oren (2006). Septic arthritis caused by *Mycobacterium kansasii* in a prosthetic knee joint. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(7): 2648-2649.
- Neumann, M., R. Schulze-Robbecke, C. Hagenau et K. Behringer (1997). Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2): 547-552.
- Nieminen, T., J. Pakarinen, I. Tsitko, M. Salkinoja-Salonen, A. Breitenstein, T. Ali-Vehmas, et al. (2006). 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *Journal of Microbiological Methods* **67**(1): 44-55.

- Ninet, B., M. Monod, S. Emler, J. Pawlowski, C. Metral, P. Rohner, *et al.* (1996). Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(10): 2531-2536.
- Niva, M., A. Hernesmaa, K. Haahtela, M. Salkinoja-Salonen, K. Sivonen et K. Haukka (2006). Actinobacteria communities of boreal forest soil and lake water are rich in mycobacteria. *Boreal Environment Research* **11**(1): 45-53.
- Norby, B., G. T. Fosgate, E. J. B. Manning, M. T. Collins et A. J. Roussel (2007). Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: Association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Veterinary Microbiology* **224**(1-2): 153-159.
- Norton, C. D., M. W. LeChevallier et J. O. Falkinham (2004). Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water Research* **38**(6): 1457-1466.
- Nwachuku, N. et C. Gerba (2004). Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Current Opinion in Biotechnology* **15**(3): 175-180.
- Okazaki, M., K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugahara, C. Kawamura, *et al.* (2009). *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel, slow-growing species, related to *Mycobacterium celatum*, isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6): 1336-1341.
- Oliveira, R. S., M. P. Sircili, E. M. D. Oliveira, S. C. Balian, J. S. Ferreira-Neto et S. C. Leaˆo (2003). 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* **41**(1): 44-49.
- Ongerthi, J. E. et H. H. Stibb (1987). Identification of *Cryptosporidium* Oocysts in River Water. *Applied and Environmental Microbiology* **53**(4): 672-676.
- Ozkutuk, N., H. Gazi, S. Surucuoglu, A. Gunduz et B. Ozbakkaloglu (2007). Characterization of *rpoB* mutations by line probe assay in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the aegean region in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **60**(1): 211-213.
- Padgitt, P. J. et S. E. Moshier (1987). *Mycobacterium poriferae* sp. nov., a scotochromogenic, rapidly growing species isolated from a marine sponge. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**(3): 186-191.
- Palomino, J. C. et F. Portaels (1998). Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *Journal of Clinical Microbiology* **36**(2): 402-408.
- Parashar, D., D. S. Chauhan, V. D. Sharma, A. Chauhan, S. V. Chauhan et V. M. Katoch (2004). Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(6): 3751-3753.
- Park, H. Y., W. J. Koh, O. J. Kwon, N. Y. Lee, Y. M. Shim, Y. K. Park, *et al.* (2007). Pulmonary disease caused by *Mycobacterium xenopi*: The first case in Korea. *Yonsei medical journal* **48**(8): 871-875.
- Park, M., S. T. Yun, S. Y. Hwang, C. I. Chun et T. I. Ahn (2006). The *dps* gene of symbiotic “*Candidatus Legionella jeonii*” in amoeba proteus responds to hydrogen peroxide and phagocytosis. *Journal of Bacteriology* **188**(21): 7572-7580.
- Pavlik, I., L. Dvorska, L. Matlova, P. Svastova, I. Parmova, J. Bazant, *et al.* (2002). Mycobacterial infections in cattle in the Czech Republic during 1990-1999. *Veterinary Medicine - Czech* **47**(9): 241-250.
- Pedley, S., J. Bartram, G. Rees, A. Dufour et J. A. Cotruvo (2004). Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public health consequences, monitoring and management. S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour and J. A. Cotruvo Eds. London, in *World Health Organization titles with IWA Publishing*. **1**: 1-229.
- Petroff, S. A. (1915). A new and rapid method for the isolation and cultivation of the tubercle bacillus directly from sputum and feces. *Journal of Experimental Medicine* **XXI**: 38.
- Pettibone, G. W. (1998). Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. *Journal of Applied Microbiology* **85**(1): 723-730.
- Pickup, R. W., G. Rhodes, S. Arnott, K. Sidi-Boumedine, T. J. Bull, A. Weightman, *et al.* (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. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(4): 2130-2139.
- Pickup, R. W., G. Rhodes, J. Bull, S. Arnott, K. Sidi-Boumedine, M. Hurley, *et al.* (2006). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: Diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4067-4077.
- Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre et R. Girones (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(9): 3376-3382.
- Pizzi, R. et J. Miller (2005). Amputation of a *Mycobacterium marinum*-infected hindlimb in a African bullfrog (*Pyxicephalus adspersus*). *Veterinary Record* **156**(23): 747-748.
- Poitras, E. et A. Houde (2002). La PCR en temps réel: Principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2**(2).
- Portaels, F., L. Realini, L. Bauwens, B. Hirschel, W. M. Meyers et W. de Meurichy (1996). Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium genavense* in birds kept in a zoo: 11-year survey. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(2): 319-323.

- Pourahmad, F., F. Cervellione, K. D. Thompson, J. B. Taggart, A. Adams et R. H. Richards (2008). *Mycobacterium stomatepiae* sp. nov., a slowly growing, non-chromogenic species isolated from fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(12): 2821-2827.
- Prammananan, T., S. Phunpruch, N. Tingtoy, S. Srimuang et A. Chaiprasert (2006). Distribution of *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis patterns among *Mycobacterium avium* complex isolates in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(10): 3819-3821.
- Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein, C. M. Bacq-Calberg et J. Dusart (2003). Les bactéries : Les Gram-positifs riches en G-C. Microbiologie. J. Prescott, J. Harley and D. Klein Eds. Bruxelles, in *De Boeck Université*. **1**: 541.
- Primm, T., C. A. Lucero et J. O. Falkinham (2004). Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **17**(1): 98-106.
- Prissick, F. H. et A. M. Masson (1956). Cervical lymphadenitis in children caused by chromogenic mycobacteria. *Canadian Medical Association Journal* **75**(10): 798-803.
- Pryor, M., S. Springthorpe, S. Riffard, T. Brooks, Y. Huo, G. Davis, et al. (2004). Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Science and Technology* **50**(1): 83-90.
- Radomski, N., V. C. Thibault, C. Karoui, K. de Cruz, T. Cochar, C. Gutiérrez, et al. (2010). Genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins, studied by MIRU-VNTR and IS1311 RFLP typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **48**(4): 1026-1034.
- Raffi, F., W. R. Butler et C. E. Cerniglia (1992). Differentiation of a rapidly growing, scotochromogenic, polycyclic-aromatic-hydrocarbonmetabolizing strain of *Mycobacterium* sp. from other known *Mycobacterium* species. *Archives of Microbiology* **157**(6): 512-520.
- Rajini, M., S. R. Prasad, R. R. Reddy, R. V. Bhat et K. R. Vimala (2007). Postoperative infection of laparoscopic surgery wound due to *Mycobacterium chelonae*. *Indian Journal of Medical Microbiology* **25**(2): 163-165.
- Ramakrishnan, T., M. Suryanarayana et K. P. Gopinathan (1972). Intermediary metabolism of mycobacteria. *Bacteriological Reviews* **36**(1): 65-108.
- Realini, L., P. Van Der Stuyft, K. De Ridder, B. Hirschel et F. Portaels (1997). Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **35**(11): 2791-2794.
- Redman, J. E., M. J. Shawa, A. I. Mallet, A. L. Santos, C. A. Roberts, A. M. Gernaey, et al. (2009). Mycocerosic acid biomarkers for the diagnosis of tuberculosis in the Coimbra Skeletal Collection. *Tuberculosis* **89**(1): 267-277.
- Reed, C., C. Fordham von Reyn, S. Chumblee, T. V. Ellerbrock, J. W. Johnson, B. J. Marsh, et al. (2006). Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. *American Journal of Epidemiology* **164**(1): 32-40.
- Reed, G. B. (1957). Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. R. S. Breed, E. G. D. Murray and N. R. Smith Eds. Baltimore, in *The Williams & Wilkins Co*: 703-704.
- Regnaut, S., F. S. Lucas et L. Fumagalli (2005). DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations *Conservation Genetics* **7**(3): 449-453.
- Reischl, U., S. Emler, Z. Hoak, J. Kaustova, R. M. Kroppenstedt, N. Lehn, et al. (1998a). *Mycobacterium bohemicum* sp. nov., a new slow-growing scotochromogenic *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**(4): 1349-1355.
- Reischl, U., K. Feldmann, L. Naumann, B. J. Gaugler, B. Ninet, B. Hirschel, et al. (1998b). 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* **36**(6): 1761-1764.
- Reischl, U., H. Melzl, R. M. Kroppenstedt, T. Miethke, L. Naumann, A. Mariotitini, et al. (2006). *Mycobacterium monacense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(11): 2575-2578.
- Reisner, B. S., A. M. Gastson et G. L. Woods (1994). Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **32**(12): 2995-2998.
- Rhodes, M. W., H. Kator, S. Kotob, P. van Berkum, I. Kaattari, W. Vogelbein, et al. (2003). *Mycobacterium shottsii* sp. nov., a slowly growing species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(2): 421-424.
- Rhodes, M. W., H. Kator, A. McNabb, C. Deshayes, J. M. Reyrat, B. A. Brown-Elliott, et al. (2005). *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(3): 1139-1147.
- Richards, W., D. et C. Thoen (1977). Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *American Society for Microbiology* **6**(4): 392-395.
- Richter, E., S. Niemann, F. O. Gloeckner, G. E. Pfyffer et S. Rüschi-Gerdes (2002). *Mycobacterium holsaticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6): 1991-1996.

- Richter, E., S. Rüscher-Gerdes et D. Hillemann (2006). Evaluation of the GenoType mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(5): 1769-1775.
- Ridderhof, J. C., R. J. Wallace, J. O. Kilburn, W. R. Butler, N. Warren, E. S. Wong, *et al.* (1991). Chronic tenosynovitis of the hand due to *Mycobacterium nonchromogenicum*: Use of high-performance liquid chromatography for identification of isolates. *Reviews of Infectious Diseases* **13**(5): 857-864.
- Rigouts, L., O. Nolasco, P. de Rijk, E. Nduwamahoro, A. Van Deun, A. Ramsay, *et al.* (2007). Newly developed primers for comprehensive amplification of the *rpoB* gene and detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(1): 252-254.
- Ringuet, H., C. Akoua-Koffi, S. Honores, A. Varnerot, V. Vincent, P. Berche, *et al.* (1999). *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(3): 852-857.
- Ripoll, F., S. Pasek, C. Schenowitz, C. Dossat, V. Barbe, M. Rottman, *et al.* (2009). Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **4**(6): 1-12.
- Rockne, K. J., W. Liang, L. Y. Young et G. L. Taghon (2003). Toxicity of density separation media to *Escherichia coli* and *Mycobacterium* strain PC01: Implication for density-separation of soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **43**(2): 185-189.
- Rodríguez, S., B. Romero, J. Bezos, L. de Juan, J. Alvarez, E. Castellanos, *et al.* (2010). High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary Microbiology* **141**(1-2): 89-95.
- Ross, A. J. (1960). *Mycobacterium salmoniphilum* sp. nov. from salmonids fishes. *American Review of Respiratory Diseases* **81**(1): 241-250.
- Ross, B. C., P. D. Johnson, F. Oppedisano, L. Marino, A. Sievers, T. Stinear, *et al.* (1997). Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(10): 4135-4138.
- Roszak, D. B. et R. R. Colwell (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* **51**(3): 365-379.
- Roth, A., U. Reischl, N. Schönfeld, L. Naumann, S. Emler, M. Fischer, *et al.* (2000). *Mycobacterium heckeshornense* sp. nov., a new pathogenic slowly growing *Mycobacterium* sp. causing cavitary lung disease in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(11): 4102-4107.
- Ruiz-Manzano, J., J. M. Manterola, F. Gamboa, A. Calatrava, E. Monsó, C. Martínez, *et al.* (2008). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplification kits. *Chest* **118**(1): 648-655.
- Saitou, N. et M. Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular and Biology Evolution* **4**(4): 406-425.
- Salah, I. B. (2009). Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **15**: 894-905.
- Salem, J. I., C. M. Carvalho, M. M. Ogusku, R. Maia et A. Ruffino-Netto (2007). PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. *Acta Amazonica* **37**(3): 419-424.
- Santos, R., J. Fernandes, N. Fernandes, F. Oliveira et M. Cadete (2007). *Mycobacterium parascrofulaceum* in acidic hot springs in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(15): 5071-5073.
- Schaible, U. E., S. Sturgill-Koszycki, P. H. Schlesinger et D. G. Russell (1998). Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *Journal of Immunology* **160**(3): 1290-1296.
- Schinsky, M. F., M. M. McNeil, A. M. Whitney, A. G. Steigerwalt, B. A. Lasker, M. M. Floyd, *et al.* (2000). *Mycobacterium septicum* sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(2): 575-581.
- Schinsky, M. F., R. E. Morey, A. G. Steigerwalt, M. P. Douglas, R. W. Wilson, M. M. Floyd, *et al.* (2004). Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: Description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5): 1653-1667.
- Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue et D. Warshawsky (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(1): 13-19.
- Schroder, K. H. et I. Juhlin (1977). *Mycobacterium malmoense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **27**(3): 241-246.
- Schröder, K. H., L. Naumann, R. M. Kroppenstedt et U. Reischl (1997). *Mycobacterium hassiacum* sp. nov., a new rapidly growing thermophilic *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(1): 86-91.
- Schulze-Röbbecke, R., A. Weber et R. Fischeder (1991). Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples. *Journal of Microbiological Methods* **14**(3): 177-183.

- Schwabacher, H. (1959). A strain of *Mycobacterium* isolated from skin lesions of a cold blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relation to atypical acid-fast bacilli occurring in man. *Journal of Hygiene* **57**(1): 57-67.
- Selvakumar, N., M. Gomathi Sekar, V. Kumar, D. Vijaya Bhaskar Rao, F. Rahman et P. R. Narayanan (2006). Sensitivity of Ziehl-Neelsen method for centrifuged deposit smears of sputum samples transported in cetyl-pyridinium chloride. *Indian Journal of Medical Research* **124**(1): 439-442.
- Senna, S. G., J. Battilana, J. C. Costa, M. G. Silva, R. S. Duarte, L. S. Fonseca, et al. (2008). Sequencing of *hsp65* gene for identification of *Mycobacterium* species isolated from environmental and clinical sources in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* **46**(11): 3822-3825.
- September, S. M., V. S. Brözel et S. N. Venter (2004). Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12): 7571-7573.
- Serra, C., G. Loi, B. Saddi, M. Pautasso et A. Manzin (2007). Unusual clinical presentation of *Mycobacterium fortuitum* infection in an immunocompetent woman. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(5): 1663-1665.
- Sharma, S., P. Sachdeva et J. S. Viridi (2003). Emerging water-borne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**(5-6): 424-428.
- Shinnick, T. M. et R. C. Good (1994). Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **13**(11): 884-901.
- Shojaei, H., M. Goodfellow, J. G. Magee, R. Freeman, F. K. Gould et C. G. Brignall (1997). *Mycobacterium novocastrense* sp. nov., a rapidly growing photochromogenic *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(4): 1205-1207.
- Shojaei, H., J. G. Magee, R. Freeman, M. Yates, N. U. Horadagoda et M. Goodfellow (2000). *Mycobacterium elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(5): 1817-1819.
- Shor, L., W. Liang, K. J. Rockne, L. Y. Young, G. Taghon et D. Kosson (2003). Intra-aggregate mass transport-limited bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to *Mycobacterium* strain PC01. *Environmental Science & Technology* **37**(8): 1545-1552.
- Shrestha, N. K., M. J. Tuohy, G. S. Hall, U. Reischl, S. M. Gordon et G. W. Procop (2003). Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and non tuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(11): 5121-5126.
- Simmon, K. E., Y. Y. Low, B. A. Brown-Elliott, R. J. Wallace et C. A. Petti (2009). Phylogenetic analysis of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium neoaurum* with redescription of *M. aurum* culture collection strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6): 1371-1375.
- Skerman, V. B. D., V. McGowan et P. H. A. Sneath (1989). Approved lists of bacterial names. A. edition Eds. Washington (DC), in *American Society of Microbiology Press*.
- Smole, S. C., F. McAleese, J. Ngampasutadol, C. F. von Reyn et R. D. Arbeit (2002). Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by Restriction and Sequence Analysis of *hsp65*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(9): 3374-3380.
- Snizek, P. J., B. S. Graham, H. B. Busch, E. R. Lederman, M. L. Lim, K. Poggemyer, et al. (2003). Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. *Archives of Dermatological Research* **139**(1): 629-634.
- Soini, H., X. Pan, A. Amin, E. A. Graviss, A. Siddiqui et J. M. Musser (2000). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(2): 669-676.
- Sola, C., S. Ferdinand, C. Mammina, A. Nastasi et N. Rastogi (2001). Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on Spoligotyping and Variable Number of Tandem DNA Repeats and comparison with a Spoligotyping database for population-based analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(4): 1559-1565.
- Soldati, G., Z. H. Lu, L. Vaughan, A. Polkinghorne, D. R. Zimmermann, J. B. Huder, et al. (2004). Detection of *Mycobacteria* and *Chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: A retrospective study. *Veterinary Pathology* **41**(4): 388-397.
- Solo-Gabrielle, H. M., M. A. Wolfert, T. R. Desmarais et C. J. Palmer (2000). Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(1): 230-237.
- Somaskövi, A., J. E. Hotaling, M. Fitzgerald, V. Jonas, D. Stasik, L. M. Parsons, et al. (2000). False-positive results for *Mycobacterium celatum* with the AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* complex assay. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(7): 2743-2745.
- Sompolinsky, D., A. Lagziel, D. Naveh et L. Yankilevitz (1978). *M. haemophilum* sp. nov., a new pathogen of humans. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**(1): 67-75.
- Sood, A., R. Sreedhar, P. Kulkarni et A. R. Nawoor (2007). Hypersensitivity pneumonitis-like granulomatous lung disease with nontuberculous mycobacteria from exposure to hot water aerosols. *Environmental Health Perspectives* **115**(2): 262-266.
- Soudani, A., S. Hadjfredj, M. Zribi, A. Masmoudi, T. Messaoud, H. Tiouri, et al. (2007).

- Characterization of Tunisian *Mycobacterium tuberculosis* rifampin-resistant clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(9): 3095-3097.
- Springer, B., E. C. Böttger, P. Kirschner et R. J. Wallace (1995a). Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**(2): 262-267.
- Springer, B., P. Kirschner, G. Rost-Meyer, K. H. Schroder, R. M. Kroppenstedt et E. C. Böttger (1993). *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(12): 3083-3089.
- Springer, B., E. Tortoli, I. Richter, R. Grünewald, S. Rüscher-Gerdes, K. Uschmann, et al. (1995b). *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. *Journal of Clinical Microbiology* **33**(11): 2805-2811.
- Springer, B., W. K. Wu, T. Bodmer, G. Haase, G. E. Pfyffer, R. M. Kroppenstedt, et al. (1996). Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: Description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(5): 1100-1107.
- Stadthagen-Gomez, G., A. C. Helguera-Repetto, J. F. Cerna-Cortes, R. A. Goldstein, R. A. Cox et J. A. Gonzalez-y-Merchand (2008). The organization of two rRNA (*rrn*) operons of the slow-growing pathogen *Mycobacterium celatum* provides key insights into mycobacterial evolution. *FEMS Microbiology Letters* **280**(1): 102-112.
- Stager, C. E., J. P. Libonati, S. H. Siddiqi, J. R. Davis, N. M. Hooper, J. F. Baker, et al. (1991). Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *Journal of Clinical Microbiology* **29**(1): 154-157.
- Stahl, D. A. et J. W. Urbance (1990). The Division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **172**(1): 116-124.
- Stanford, J. L. et W. J. Gunthorpe (1971). A study of some fast-growing scotochromogenic mycobacteria including species descriptions of *Mycobacterium gilvum* (new species) and *Mycobacterium duvalii* (new species). *British Journal of Experimental Pathology* **52**(1): 627-637.
- Steck, P. A., B. A. Schwartz, M. S. Rosendahl et G. R. Gray (1978). Mycolic acids - a reinvestigation. *The Journal of Biological Chemistry* **253**(16): 5625-5629.
- Steed, K. A. et J. O. Falkinham (2006). Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4007-4011.
- Steinert, M., K. A. Birkness, E. H. White, B. Fields et F. Quinn (1998). *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(6): 2256-2261.
- Stinear, T., J. K. Davies, G. A. Jenkin, J. A. Hayman, F. Oppedisano et P. D. Johnson (2000). 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* **66**(8): 3206-3213.
- Stinear, T. P., T. Seemann, P. F. Harrison, G. A. Jenkin, J. K. Davies, P. D. R. Johnson, et al. (2010). Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research* **18**(1): 729-741.
- Sugita, H., K. Tanaka, M. Yoshinami et Y. Deguchi (1995). Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(11): 4128-4130.
- Sung, N. et M. T. Collins (2003). Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6833-6840.
- Sung, N., K. Takayama et M. T. Collins (2004). Possible Association of GroES and antigen 85 proteins with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(3): 1688-1697.
- Sutherland, T. D., I. Horne, R. L. Harcourt, R. J. Russel et J. G. Oakeshott (2002). Isolation and characterization of *Mycobacterium* strain that metabolizes the insecticide endosulfan. *Journal of Applied Microbiology* **93**(3): 380-389.
- Swanson, D. S., V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, R. Frothingham et J. M. Musser (1997). 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* **47**(2): 414-419.
- Tacquet, A. et F. Tison (1961). Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium. *Annales de l'Institut Pasteur* **100**: 676-680.
- Tacquet, A. et F. Tison (1966). L'utilisation des détergents pour l'isolement des mycobactéries. *Bulletin of the International Union Against Tuberculosis* **38**(1): 59-67.
- Takade, A., A. Umeda, M. Matsuoka, S. I. Yoshida, M. Nakamura et K. Amako (2003). Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique. *Microbiology and Immunology* **47**(4): 265-270.
- Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Botrger et T. Bodmer (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by Polymerase

- Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **32**(2): 175-178.
- Thibert, L. et S. Lapierre (1993). Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(7): 1759-1763.
- Thomson, R., R. Carter, C. Gilpin, C. Coulter et M. Hargreaves (2008). Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(10): 3094-3098.
- Thorel, M. F. (1989). Relationship between *Mycobacterium avium*, *M. paratuberculosis* and mycobacteria associated with Crohn's disease. *Annals de Recherches Vétérinaires* **20**(1): 417-429.
- Thorel, M. F. et H. Boisvert (1976). Action de l'acide sulfurique à 4 p. cent sur les diverses espèces de mycobactéries. *Annales de Biologie Clinique* **34**(1): 431-435.
- Thorel, M. F., M. Krichevsky et V. V. Lévy-Frèbault (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**(3): 254-260.
- Thornton, C. G., K. M. Maclellan, T. L. Brink et S. Passen (1998). In vitro comparison of NALC-NaOH, tween 80, and C18 carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **36**(12): 3558-3566.
- Timpe, A. et E. H. Runyon (1954). The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **44**(2): 202-209.
- Tobler, N. E., M. Pfunder, K. Herzog, J. E. Frey et M. Altwegg (2006). Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-Microarray. *Journal of Microbiological Methods* **66**(1): 116-124.
- Torkko, P., S. Suomalainen, E. Iivanainen, M. Suutari, L. Paulin, E. Rudbäck, et al. (2001). Characterization of *Mycobacterium bohemicum* isolated from human, veterinary, and environmental sources. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(1): 207-211.
- Torkko, P., S. Suomalainen, E. Iivanainen, M. Suutari, E. Tortoli, L. Paulin, et al. (2000). *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *Mycobacterium botniense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(1): 283-289.
- Torkko, P., S. Suomalainen, E. Iivanainen, E. Tortoli, M. Suutari, J. Seppänen, et al. (2002). *Mycobacterium palustre* sp. nov., a potentially pathogenic, slowly growing *Mycobacterium* isolated from clinical and veterinary specimens and from Finnish stream waters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(5): 1519-1525.
- Tortoli, E. (2006). The newmycobacteria: An update. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **48**(1): 159-178.
- Tortoli, E., S. Baruzzo, Y. Heijdra, H. P. Klenk, S. Lauria, A. Mariottini, et al. (2009). *Mycobacterium insubricum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6): 1518-1523.
- Tortoli, E., R. M. Kroppenstedt, A. Bartoloni, G. Caroli, I. Jan, J. Pawlowski, et al. (1999). *Mycobacterium tusciae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**(4): 1839-1844.
- Tortoli, E., A. Mariottini et G. Mazzarelli (2003). Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(9): 4418-4420.
- Tortoli, E., C. Piersimoni, R. M. Kroppenstedt, J. I. Monyayo-Burgos, U. Reischl, A. Giacometti, et al. (2001). *Mycobacterium doricum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(6): 2007-2012.
- Tortoli, E., L. Rindi, M. J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, et al. (2004). Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(4): 1277-1285.
- Tortoli, E., L. Rindi, K. S. Goh, M. L. Katila, A. Mariottini, R. Mattei, et al. (2005). *Mycobacterium florentinum* sp. nov., isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(3): 1101-1106.
- Torvinen, E., M. J. Lehtola, P. J. Martikainen et I. T. Miettinen (2007). Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(19): 6201-6207.
- Torvinen, E., S. Suomalainen, M. J. Lehtola, I. T. Miettinen, O. Zacheus, L. Paulin, et al. (2004). Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(4): 1973-1981.
- Trevisan, V. (1889a). Generi e le specie delle batteriacee. Z. a. Gabuzzi Eds. Milano, in.
- Trevisan, V. (1889b). I generi e la specie dell batteriacee. *Zanaboni e Gabuzzi Milano* **1**(1): 14.
- Trujillo, M., E. Velazquez, R. M. Kroppenstedt, P. Schumann, R. Rivas, P. F. Mateos, et al. (2004). *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5): 1459-1463.
- Tsai, H. C., S. S. Lee, S. R. Wann, Y. S. Chen, Y. W. Liu et Y. C. Liu (2006). *Mycobacterium marinum*

- tenosynovitis: Three case reports and review of the literature. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **59**(5): 337-340.
- Tsintzou, A., A. Vantarakis, O. Pagonopoulou, A. Athanassiadou et M. Papapetropoulou (2000). Environmental mycobacteria in drinking water before and after replacement of the water distribution network. *Water, Air and Soil Pollution* **120**(1): 273-282.
- Tsukamura, M. (1965). A group of mycobacteria from soil resources resembling nonphotochromogens (Group 3). *Medicine and Biology* **71**(1): 110-113.
- Tsukamura, M. (1966). Adansonian classification of mycobacteria. *Journal of General Microbiology* **45**(2): 253-273.
- Tsukamura, M. (1967). *Mycobacterium chitae*: A new species. *Japanese Journal of Microbiology* **11**(1): 43-47.
- Tsukamura, M. (1981). Numerical analysis of rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium agri* (Tsukamura 1972) Tsukamura sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**(3): 247-258.
- Tsukamura, M. (1982). *Mycobacterium shimoidei* sp. nov., nom. rev., a lung pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**(1): 67-69.
- Tsukamura, M., S. Mizuno et H. Toyama (1983a). *Mycobacterium pulveris* sp. nov., a Nonphotochromogenic *Mycobacterium* with an Intermediate Growth Rate. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(4): 811-815.
- Tsukamura, M., S. Mizuno et S. Tsukamura (1981). Numerical analysis of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium obuense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium rhodesiae* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium aichiense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium chubuense* sp. nov., nom. rev., and *Mycobacterium tokaiense* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**(3): 263-275.
- Tsukamura, M., H. Nemoto et H. Yugi (1983b). *Mycobacterium porcinum* sp. nov., a porcine pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(2): 162-165.
- Tsukamura, M., H. Toyama et S. Mizuno (1965). *Mycobacterium parafortuitum*, a new species. *Medicine and Biology* **70**(1): 232-235.
- Tsukamura, M., H. J. van der Meulen et W. O. K. Grabow (1983c). 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* **33**(3): 460-449.
- Tsukamura, M., I. Yano et T. Imaeda (1986). *Mycobacterium moriokaense* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic *Mycobacterium*. *International journal of Systematic Bacteriology* **36**(2): 333-338.
- Turenne, C., C. Chedore, J. Wolfe, F. Jamieson, G. Broukhanski, K. May, et al. (2002). *Mycobacterium lacus* sp. nov., a novel slowly growing, non-chromogenic clinical isolate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6): 2135-2140.
- Turenne, C. Y., V. J. Cook, T. V. Burdz, R. J. Pauls, L. Thibert, J. N. Wolfe, et al. (2004a). *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5): 1543-1551.
- Turenne, C. Y., M. Semret, D. V. Cousins, D. M. Collins et M. A. Behr (2006). Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(2): 433-440.
- Turenne, C. Y., L. Thibert, K. Williams, T. V. Burdz, V. J. Cook, J. N. Wolfe, et al. (2004b). *Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobe-positive for *Mycobacterium avium* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(3): 659-667.
- Turenne, C. Y., L. Tschetter, J. Wolfe et A. Kabani (2001). Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: Identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(6): 3637-3648.
- Ucko, M. et A. Colomi (2005). *Mycobacterium marinum* infections in fish and humans in Israel. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(2): 892-895.
- Unno, T., J. Jang, D. Han, J. H. Kim, M. J. Sadowsky, O. S. Kim, et al. (2010). Use of barcoded pyrosequencing and shared OTUs to determine sources of fecal bacteria in watersheds. *Environmental Science and Technology* **44**(20): 7777-7782.
- Uyttebroek, M., P. Breugelmans, M. Janssen, P. Wattiau, B. Joffe, U. Karlson, et al. (2006). *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. *Environmental Microbiology* **8**(5): 836-847.
- Uyttebroek, M., A. Spoden, J. J. Ortega-Calvo, K. Wouters, P. Wattiau, L. Bastiaens, et al. (2007a). Differential responses of *Eubacterial*, *Mycobacterium*, and *Sphingomonas* communities in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. *Journal of Environmental Quality* **36**(1): 1403-1411.
- Uyttebroek, M., S. Vermeir, P. Wattiau, A. Ryngaert et D. Springael (2007b). Characterization of cultures enriched from acidic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(10): 3159-3164.
- Vaerewijck, M. J. M., G. Huys, J. C. Palomino, J. Swings et F. Portaels (2005). Mycobacteria in

- drinking water distribution systems; ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews* **29**(1): 911-934.
- van der Geize, R., K. Yam, T. Heuser, M. H. Wilbrink, H. Hara, M. C. Anderton, *et al.* (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(6): 1947-1952.
- van der Sar, A. M., A. M. Abdallah, M. Sparrius, E. Reinders, C. M. Vandembroucke-Grauls *et al.* (2004). *Mycobacterium marinum* strains can be divided into two distinct types based on genetic diversity and virulence. *Infection and Immunity* **72**(11): 6306-6312.
- van Ingen, J., S. A. M. Al-Hajoj, M. Boeree, F. Al-Rabiah, M. Enaimi, R. de Zwaan, *et al.* (2009a). *Mycobacterium riyadhense* sp. nov., a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by a commercial line-probe assay. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(5): 1049-1053.
- van Ingen, J., M. J. Boeree, W. C. M. de Lange, P. E. W. de Haas, A. G. M. van der Zanden, W. Mijs, *et al.* (2009b). *Mycobacterium noviomagense* sp. nov.; clinical relevance evaluated in 17 patients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(4): 845-849.
- van Ingen, J., M. J. Boeree, K. Kösters, A. Wieland, E. Tortoli, P. N. R. Dekhuijzen, *et al.* (2009c). Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(9): 2277-2282.
- van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P. E. W. de Haas, P. W. M. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, *et al.* (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(4): 1236-1245.
- Vantarakis, A., A. Tsintzou, A. Diamandopoulos *et al.* (1998). Nontuberculosis mycobacteria in hospital water supplies. *Water, Air, and Soil Pollution* **104**(1): 331-337.
- Veyrier, F., D. Pletzer, C. Turenne *et al.* (2009). Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evolutionary Biology* **9**(8): 1-14.
- Vugia, D. J., Y. Jang, C. Zizek, J. Ely, K. L. Winthrop *et al.* (2005). Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California. *Emerging Infectious Diseases* **11**(4): 616-618.
- Vuorio, R., M. A. Andersson, F. A. Rainey, R. M. Kroppenstedt, P. Kämpfer, H. J. Busse, *et al.* (1999). 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* **49**(1): 25-35.
- Walker, J. T., D. J. Bradshaw, A. M. Bennett, M. R. Fulford, M. V. Martin *et al.* (2000). Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8): 3363-3367.
- Wallace, J. R. J. J., Y. Zhang, R. W. Wilson, L. Mann *et al.* (2002). Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5580-5584.
- Wang, R. F., A. R. Jefferson *et al.* (1998). *Mycobacterium anthracenicum*: PAH-degrading strain, isolated by Saowanit Tongpim *GenBank*
- Wang, S. X., L. H. Sng *et al.* (2004). Preliminary study on rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by the BD ProbeTec ET system. *Journal of Medical Microbiology* **53**(1): 57-59.
- Wayne, L. G. (1966). Classification and identification of mycobacteria. III. Species within Group III. *American Review of Respiratory Diseases* **93**(9): 919-928.
- Wayne, L. G., R. C. Good, A. Tsang, R. Butler, D. Dawson, D. Groothuis, *et al.* (1993). Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: A cooperative study of the international working group on Mycobacterial taxonomy. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(3): 482-489.
- Weiss, D. J., O. A. Evanson, D. J. McClenahan, M. Abrahamsen *et al.* (2001). Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infection and Immunity* **69**(2): 1002-1008.
- Weiszfeiler, J., G. V. Karasseva *et al.* (1971). A new *Mycobacterium* species: *Mycobacterium asiaticum* n. sp. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **18**(1): 247-252.
- Whan, L., H. J. Ball, I. R. Grant *et al.* (2005). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(11): 7107-7112.
- White, D. C., C. A. Lytle, Y. D. M. Gan, Y. M. Piceno, M. H. Wimpee, A. D. Peacock, *et al.* (2002). Flash detection/identification of pathogens, bacterial spores and bioterrorism agent biomarkers from clinical and environmental matrices. *Journal of Microbiological Methods* **42**(2-3): 139-147.
- Whittier, S., R. L. Hopfer, M. R. Knowles *et al.* (1993). Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(4): 861-864.

- Whittington, R. J., I. Marsh, S. McAllister, M. J. Turner, D. J. Marshall et C. A. Fraser (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(4): 1077-1083.
- Whittington, R. J., J. Marshall, P. J. Nicholls, L. B. Marsh et L. A. Reddacliff (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(5): 2989-3004.
- Williamson, H. R., M. E. Benbow, K. D. Nguyen, D. C. Beachboard, R. K. Kimbirauskas, M. D. McIntosh, et al. (2008). Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli ulcer endemic and non-endemic aquatic sites in Ghana. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2**(3): e205.
- Willumsen, P., U. Karlson, E. Stackebrandt et R. M. Kroppenstedt (2001). *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(5): 1715-1722.
- Wilson, R. W., V. A. Steingrube, E. C. Böttger, B. Springer, B. A. Brown-Elliott, V. Vincent, et al. (2001). *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: An international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(5): 1751-1764.
- Winthrop, K. L., M. Abrams, M. A. Yakrus, I. Schwartz, J. Ely, D. Gillies, et al. (2002). An outbreak of mycobacterial *furunculosis* associated with footbaths at a nail salon. *New England Journal of Medicine* **346**(18): 1366-1371.
- Witte, C. L., L. L. Hungerford, R. Papendick, I. H. Stalis et B. A. Rideout (2008). Investigation of characteristics and factors associated with avian mycobacteriosis in zoo birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**(1): 186-196.
- Woods, G. L. et D. H. Walker (1996). Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clinical Microbiology Reviews* **9**(3): 382-404.
- Wu, X., J. Zhang, J. Liang, Y. Lu, H. Li, C. Li, et al. (2007). Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(6): 1898-1903.
- Xiao, L., A. Singh, J. Limor, T. K. Graczyk, S. Gradus et A. LAL (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(3): 1097-1101.
- Yajko, D. M., P. S. Nassos, C. A. Sanders, P. C. Gonzalez, A. L. Reingold, C. R. Horsburgh, et al. (1993). Comparison of four decontamination methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from stools. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(2): 302-306.
- Yano, T., S. Okuda, K. Kato, K. Kato et T. Kishimoto (2004). *Mycobacterium kansasii* osteomyelitis in a patient with AIDS on highly active antiretroviral therapy. *Internal Medicine* **43**(11): 1084-1086.
- Yoder, S., C. Argueta, A. Holtzman, T. Aronson, O. G. W. Berlin, P. Tomasek, et al. (1999). PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6): 2650-2653.
- Yzquierdo, S. S. L., C. L. Mederos, G. A. Díaz, F. M. Echemendia et C. E. Montoro (2007). Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. *Microbiología Clínica* **24**(5): 391-396.
- Zhang, Q., R. Kennon, M. A. Koza, K. Hulten et J. E. Clarridge (2002). Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(4): 1134-1139.
- Zolg, J. W. et S. Philippi-Schulz (1994). The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **32**(11): 2801-2812.
- Zopf, W. (1883). Die spaltpilze. E. Trewendt Eds. Breslau, in *Die spaltpilze*.

ANNEXES

**Introduction
générale**

**CHAPITRE I
Mycobactéries et bassins versants**

**CHAPITRE II
Développements analytiques**

**CHAPITRE III
Sources environnementales et comportements**

**CHAPITRE IV
Voies d'amélioration**

**Conclusion générale
et perspectives**

Références

Annexes

Annexe 1 : Détermination de la diversité génotypique des sous-espèces de <i>Mycobacterium avium</i> d'origine humaine et animale par méthodes de typage moléculaire VNTR-MIRU et RFLP-IS1311.....	193
Annexe 2 : Mise à jour de l'historique des descriptions de nouvelles espèces mycobactériennes (Kazda 2009), tuberculeuses ^(T) , lépreuses ^(L) ou non-tuberculeuses ^(N) , à croissance rapide ^(R) , intermédiaire ^(I) ou lente ^(S) , et validées ^(V) dans la dernière liste des noms bactériens approuvés (Skerman <i>et al.</i> 1989), proposées pour validation ^(P) , ou décrites non formellement ^(D)	206
Annexe 3 : Etudes rapportant des cas humains de mycobactérioses ganglionnaires (A), pulmonaires (B), cutanées (C), ou particulières (D), causées ou présumées causées par de l'eau contaminée	209
Annexe 4 : Classification de Runyon (Euzéby 2010).....	210
Annexe 5 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe I de Runyon (Euzéby 2010)	210
Annexe 6 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe II de Runyon (Euzéby 2010)	210
Annexe 7 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe III de Runyon (Euzéby 2010)	211
Annexe 8 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe IV de Runyon (Euzéby 2010)	211
Annexe 9 : Dendrogramme par distance Kimura's Two-parameter, embranchement Neighborhood Joining, et 1000 répétition de calcul de séquences du gène <i>rrs</i> de bacilles acido-alcool-résistants isolés de la Seine (cercle noir) et de séquences de référence GenBank (numéro d'accès en face des microorganismes)	212
Annexe 10 : Dendrogramme par distance Kimura's Two-parameter, embranchement Neighborhood Joining, et 1000 répétition de calcul de séquences du gène <i>hsp65</i> de bacilles acido-alcool-résistants isolés de la Seine (cercle noir) et de séquences de référence GenBank (numéro d'accès en face des microorganismes)	213

Annexe 1 : Détermination de la diversité génotypique des sous-espèces de *Mycobacterium avium* d'origine humaine et animale par méthodes de typage moléculaire VNTR-MIRU et RFLP-IS1311

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2010, p. 1026–1034
0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01869-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 48, No. 4

Determination of Genotypic Diversity of *Mycobacterium avium* Subspecies from Human and Animal Origins by Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit–Variable-Number Tandem-Repeat and IS1311 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Methods^{∇†}

Nicolas Radomski,^{1‡} Virginie C. Thibault,² Claudine Karoui,¹ Krystel de Cruz,¹ Thierry Cochard,² Cristina Gutiérrez,³ Philip Supply,^{4,5} Frank Biet,^{2§} and María Laura Boschirolì^{1§*}

Unité Zoonoses Bactériennes, Laboratoire d'Études et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 23 Av. du Général de Gaulle, Maisons-Alfort F-94706 Cedex, France¹; INRA, UR1282, Infectiologie Animale, Santé Publique (LASP-311), INRA Centre de Tours, Nouzilly F-37380, France²; FIND, Foundation for Innovative New Diagnostics, Avenue de Budé 16, 1202 Geneva, Switzerland³; and INSERM U629⁴ and Institut Pasteur de Lille,⁵ 1, Rue du Professeur Calmette, BP 447, Lille F-59021 Cedex, France

Received 22 September 2009/Returned for modification 30 December 2009/Accepted 19 January 2010

Members of the *Mycobacterium avium* complex (MAC) are ubiquitous bacteria that can be found in water, food, and other environmental samples and are considered opportunistic pathogens for numerous animal species, mainly birds and pigs, as well as for humans. We have recently demonstrated the usefulness of a PCR-based mycobacterial interspersed repetitive-unit–variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing for the molecular characterization of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains exclusively isolated from AIDS patients. In the present study we extended our analysis, based on eight MIRU-VNTR markers, to a strain collection comprehensively comprising the other *M. avium* subspecies, including *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, and *M. avium* subsp. *silvaticum*, isolated from numerous animal species, HIV-positive and HIV-negative humans, and environmental sources. All strains were fully typeable, with the discriminatory index being 0.885, which is almost equal to that obtained by IS1311 restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing as a reference. In contrast to IS1311 RFLP typing, MIRU-VNTR typing was able to further discriminate *M. avium* subsp. *avium* strains. MIRU-VNTR alleles strongly associated with or specific for *M. avium* subspecies were detected in several markers. Moreover, the MIRU-VNTR typing-based results were consistent with a scenario of the independent evolution of *M. avium* subsp. *avium*/*M. avium* subsp. *silvaticum* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *hominissuis*, previously proposed on the basis of multilocus sequence analysis. MIRU-VNTR typing therefore appears to be a convenient typing method capable of distinguishing the three main subspecies and strains of the complex and providing new epidemiological knowledge on MAC.

The most frequent agents of nontuberculous mycobacterioses belong to the *Mycobacterium avium* complex (MAC); in particular, *M. avium* subsp. *hominissuis* is a frequent agent of human mycobacterioses (12, 25). Members of this subspecies are also frequent infectious agents for pigs, leading to significant economic losses in pig farming, albeit that subspecies produces very low rates of morbidity in this animal species (23, 24). Two other MAC members, *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, are the causative agents of two

other important, often fatal (2) animal pathologies, avian tuberculosis (40) and ruminant paratuberculosis (Johne's disease) (6), respectively. Like other opportunistic agents, *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *hominissuis* are also capable of infecting a wide range of animal species, including cattle, deer, wild boars, goats, and horses (40). In contrast, *M. avium* subsp. *silvaticum* is taxonomically very close to *M. avium* subsp. *avium* but almost exclusively infects wood pigeons (41).

In the particular case of *M. avium* subsp. *hominissuis*, strains with similar or identical genotypes are usually found in common between pigs and human patients (26), which does not permit the potential zoonotic risk of this subspecies to be discarded. Moreover, these mycobacteria can be found in environmental sources such as water, biofilms, soil, aerosols, and phagocytic protozoa and amoebae (11), all of which can act as common sources of infection for animals and humans.

For epidemiological investigations of MAC, the current reference molecular typing technique is restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) based on the IS1245 (47) and IS1311 (19, 20) insertion sequences. Whereas IS1311

* Corresponding author. Mailing address: Unité Zoonoses Bactériennes, LERPAZ, AFSSA, 23 Avenue du Général-de-Gaulle, Maisons-Alfort F-94706 Cedex, France. Phone: 33 1 49 77 13 21. Fax: 33 1 49 77 13 44. E-mail: ml.boschirolì@afssa.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jcm.asm.org/>.

‡ Present address: Université Paris-Est, Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains, UMR MA 102-AgroParisTech, Ecole des Ponts ParisTech, 6-8 Avenue Blaise Pascal, Cité Descartes Champs sur Marne, Marne-la-Vallée F-77455, France.

§ F.B. and M.L.B. contributed equally to this work.

∇ Published ahead of print on 27 January 2010.

RFLP usually generates clear hybridization patterns, IS1245 RFLP yields complex multiband patterns which are difficult to compare among different experiments and laboratories, mainly because of the heterogeneity in the intensities of the hybridization bands (19, 20, 42). Recently, an even simpler PCR-based molecular typing method, multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA), which is based on mycobacterial repetitive elements called mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem repeats (MIRU-VNTRs) (14, 34, 36, 37), has been described for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (38). This method presented better results for the differentiation of strains of this subspecies than those obtained by the standard IS900 RFLP method (38) and showed a promisingly good discrimination index (DI) with a panel of *M. avium* strains isolated from human AIDS patients (38).

In the study described here, we extended that initial study by applying MIRU-VNTR typing to a large strain panel set comprising *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium*, and *M. avium* subsp. *silvaticum* strains isolated from diverse animal and human sources. Our aim was to further analyze the power of MIRU-VNTR typing to discriminate isolates within these subspecies and to identify possible specific signatures within the complex for better characterization and detection of interspecies transmission patterns.

MATERIALS AND METHODS

Strain collection and species identification. A collection of 117 strains was assembled for this study: 62 isolated from domesticated pigs, 9 from wild birds, 4 from wood pigeons, 8 from poultry, 14 from cattle, 5 from HIV-positive (HIV⁺) patients, 9 from HIV-negative (HIV⁻) patients, 2 from wild boars, 1 from a kangaroo, 1 from a goat, 1 from a cat, and 1 from a soil sample (see Table S1 in the supplemental material for details). The human isolates belonged to the Pasteur Institute (Paris, France) collection (31). The animal isolates belonged to the Animal Mycobacterioses National Reference Laboratory (AFSSA; Maisons-Alfort, France). All strains except the strains isolated from wood pigeons were grown until they reached stationary phase in 10 ml Middlebrook 7H9 broth without mycobactin. For the strains isolated from wood pigeons, considered to be *M. avium* subsp. *silvaticum*, mycobactin J was added. Strain identification was performed by biochemical and culture phenotypic characterization, which does not distinguish *M. avium* from *M. intracellulare* strains (8). In order to retain only taxonomically recognized *M. avium* strains and discard any *M. intracellulare* strains from our collection, a PCR targeting IS1245, which is present in *M. avium* genomes but not in *M. intracellulare* genomes (15, 19), was performed as described previously (19). Likewise, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, and *M. avium* subsp. *hominissuis* were distinguished by testing for the presence of IS901 (22), which is present in the *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *silvaticum* genomes but not in the *M. avium* subsp. *hominissuis* genome (10, 21, 30). One hundred eighty-three *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolates previously studied by Thibault et al. (38) were additionally considered for analysis of the MIRU-VNTR typing results.

DNA extraction. DNA was extracted as described previously (1), with the following modifications. The cell pellets from the centrifugation of 10 ml of concentrated culture were washed in 1 ml of 1× TE buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 1 mM EDTA). After a second centrifugation, the cells were resuspended in 400 µl of 1× TE buffer and lysed by addition of 50 µl of 10 mg/ml lysozyme and 12 h of incubation at 37°C with agitation at 650 rpm, followed by addition of 70 µl of 10% SDS and 5 µl of 10 mg/ml proteinase K and 10 min of incubation at 65°C with agitation at 650 rpm. Subsequently, 100 µl of 5 M NaCl and 100 µl of cetyltrimethylammonium bromide-NaCl (10%/0.7 M) preheated at 65°C were added, followed by addition of 750 µl of isoamyl-chloroform (24/1). The aqueous phase was recovered by using Phase Lock Gels 5'-3' (Eppendorf). DNA was precipitated with 450 µl of isopropanol and then centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 18°C and washed with 200 µl of cold 70% ethanol. After evaporation of the ethanol at 37°C, the DNA was resuspended in 1× TE buffer and standardized at a concentration of 50 ng/µl by use of a Biophotometer apparatus (Eppendorf).

MIRU-VNTR typing. MIRU-VNTR typing was performed by using the eight loci identified as polymorphic for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K10 and

called MIRU or VNTR 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10, and 32, as described previously (38). Repeat numbers (alleles) were determined according to the amplified fragment sizes by the use of Gel Doc 2000 (Bio-Rad) and Quantity One 4.2.1 (Bio-Rad) software for fragment size calculation and according to the results obtained with a previously described allele-calling table (38). New profiles were assigned INRA, Nouzilly, MIRU-VNTR (INMV) codes (38).

IS1311 RFLP typing. IS1311 RFLP typing was performed as described previously (19, 20). Briefly, an IS1311 probe was obtained by PCR of the *M. avium* 104 reference strain (GenBank accession number NC_008595) genome, purified with QIAquick (Qiagen), and labeled by using an enhanced chemiluminescence direct labeling and detection system (Amersham, General Electric Healthcare). Genomic DNA (1 to 2 µg) was digested with the PvuII enzyme (Promega). The migrations of the restriction fragments, resolved on 0.8% agarose gels, were standardized by using a 1-kb Plus Ladder (Invitrogen) as a molecular size marker (wt/vol). The restriction fragments were blotted onto a Nytran membrane (Schleicher-Schuel) by vacuum transfer, and hybridized DNA fragments were detected according to the manufacturer's recommendations.

Strain comparison. The IS1311 RFLP and MIRU-VNTR patterns were analyzed by using Bionumerics software (version 5.0; Applied Maths, St-Martens-Latem, Belgium). Dendrograms for strain genotype comparisons were obtained by using individual or combined IS1311 RFLP and MIRU-VNTR results and the unweighted-pair group method with arithmetic averages (UPGMA) clustering method. Categorical and Dice coefficients were used for the MIRU-VNTR and IS1311 RFLP (with 3% optimization, 3% size tolerance, and visual inspection) methods, respectively. As described previously (39), the MIRU-VNTR minimum-spanning tree was calculated by using the maximum number of single-locus variants (SLVs) as a priority parameter.

Calculation of discriminatory power. The DIs for each typing methods and their combination were calculated by use of the formula described by Hunter and Gaston (16). MIRU-VNTR allelic diversity was calculated by using Nei's index (27).

RESULTS

MIRU-VNTR typing. Twenty-three MIRU-VNTR patterns, called INMVs (38), were identified for the 81 *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates and 8 were identified for the 32 *M. avium* subsp. *avium* isolates, while a single pattern was observed for the 4 *M. avium* subsp. *silvaticum* isolates (Fig. 1; see Table S1 in the supplemental material). None of the patterns deduced for *M. avium* subsp. *avium* matched those of *M. avium* subsp. *hominissuis* or *M. avium* subsp. *silvaticum*. Moreover, none of these MIRU-VNTR profiles matched those previously identified in *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (38). In contrast, two of the *M. avium* subsp. *avium* strain patterns and seven of the *M. avium* subsp. *hominissuis* strain patterns were identical to the MIRU-VNTR genotypes found among other, previously analyzed *M. avium* strains isolated from AIDS patients (38) (see Table S1 in the supplemental material). Among these, INMV patterns 51 and 43 consistently represented the majority of the isolates in both studies (39% and 19% of the *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates analyzed in the present study, respectively, and 26% and 29% of the *M. avium* isolates analyzed in the previous study, respectively). In addition, 23 genotypes were newly identified (see Table S2 in the supplemental material).

The allelic diversities were higher for virtually all MIRU-VNTR markers in *M. avium* subsp. *hominissuis* than in *M. avium* subsp. *avium*, and only two markers were monomorphic in the former species, whereas five markers were monomorphic in the latter species (Table 1), in keeping with the 3-fold higher number of *M. avium* subsp. *hominissuis* genotypes. In terms of the discriminatory hierarchy, locus X3 displayed the highest allelic diversity for both *M. avium* subsp. *hominissuis* and *M. avium* subsp. *avium*. Interestingly, in the latter case, this

Annexes

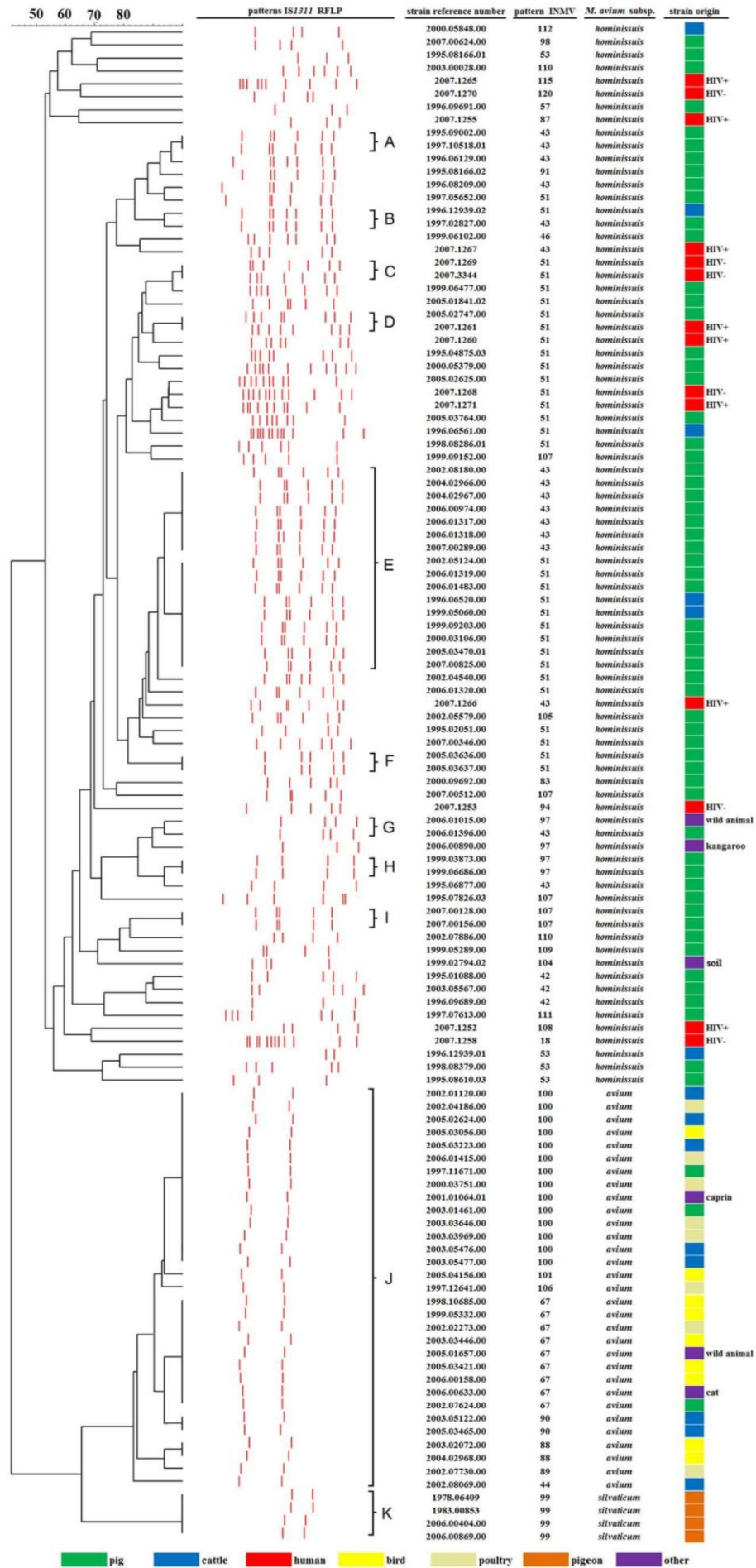


TABLE 1. MIRU-VNTR allelic distribution among *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolates

Strain panel	Locus	No. of isolates with the following MIRU-VNTR copy no.:										Allelic diversity (h) ^a	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
All subspecies ^b	X3		3	25	16	55	17		1				0.69
	25		35	69	12	1							0.55
	32						4		35	75	3		0.49
	47			73	44								0.46
	10		8	103	2		4						0.21
	292	6	1	108	2								0.14
	3		117										0
	7		117										0
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	X3		3	2	10	15	1						0.64
	25		31										0
	32							30	1				0.03
	47				31								0
	10		3	27	1								0.21
	292			31									0
	3		31										0
	7		31										0
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	X3					4							0
	25		4										0
	32								4				0
	47				4								0
	10		4										0
	292			4									0
	3		4										0
	7		4										0
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	X3			23	6	36	16		1				0.68
	25			69	12	1							0.26
	32						4		1	74	3		0.17
	47			72	10								0.20
	10		1	76	1		4						0.13
	292	6	1	73	2								0.19
	3		82										0
	7		82										0
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> ^c	X3	3	179	1									0.04
	25				176	1	6			67	8		0.07
	32									177	5	1	0.59
	47			5	178								0.05
	10		19	164									0.18
	292			6	108	69							0.51
	3	1		182									0.005
	7		12	164	3	2	2						0.19

^a Calculated by using Nei's index (27). h, genetic diversity.

^b With the exception of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, which was not integrated into the current study.

^c Data are from Thibault et al. (38).

locus actually provided most of the discriminatory power *per se*, as the only two other informative markers (markers 10 and 32) displayed a distribution highly skewed toward one strongly overrepresented allele among two or three alleles, at most. At the other extremity, markers 3 and 7 were completely monomorphic among all the *M. avium* strains in our panel.

The allelic signatures strongly or strictly associated with the subspecies. Indeed, several loci were found to be monomorphic in certain taxons. For instance, allele 1 of marker 25 was exclusively restricted to and shared by all *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *silvaticum* strains, while all *M. avium* subsp. *hominissuis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

FIG. 1. Dendrogram based on combined IS1311 RFLP typing and MIRU-VNTR typing of *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, and *M. avium* subsp. *silvaticum*. One hundred seventeen strains were isolated from pigs (green), cattle (blue), humans (red), poultry (white), birds (yellow), wood pigeons (brown), and other sources, such as wild animals, a kangaroo, a cat, a goat, and a soil sample (purple). The color codes of the sample origins are also given at the bottom. MIRU-VNTR typing was done by using eight loci, and the corresponding INMV patterns are indicated. Clusters of IS1311 RFLP patterns considered identical (within the size tolerance limits) are coded from A to K.

TABLE 2. Discrimination index (DI) of IS1311 RFLP, MIRU-VNTR used alone, and RFLP and MIRU-VNTR in combination among *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, and *M. avium* subsp. *silvaticum* isolates

Strain panel	Typing method	No. of different patterns	No. of clusters	No. of clustered isolates	No. of unique isolates	No. of isolates in each cluster	DI ^a
All subspecies	RFLP	61	11	67	50	2–31	0.912
	MIRU-VNTR	32	12	97	20	2–32	0.885
	RFLP + MIRU-VNTR	71	13	59	58	2–14	0.971
	RFLP	1	0	0	31		0
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	MIRU-VNTR	8	4	27	4	2–14	0.723
	RFLP + MIRU-VNTR	8	4	27	4	2–14	0.723
	RFLP	59	9	32	50	2–16	0.961
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	MIRU-VNTR	23	7	66	16	2–32	0.807
	RFLP + MIRU-VNTR	62	8	28	54	2–9	0.981
	RFLP	1	0	4	0	4	0
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	MIRU-VNTR	1	0	4	0	4	0
	RFLP + MIRU-VNTR	1	0	4	0	4	0

^a Calculated as described by Hunter and Gaston (16).

strains contained two or more repeats in this locus (Table 1; see Table S1 in the supplementary material). Likewise, only minimal overlap was detected among the allelic distributions of locus 32. All of the *M. avium* subsp. *silvaticum* strains and all but one of the *M. avium* subsp. *avium* strains shared allele 7 in this marker, while all but one *M. avium* subsp. *hominissuis* strain and all but one *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain displayed eight repeats or more. Alleles 3 and 4 of locus 292 were exclusively restricted to and shared by most *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains.

MIRU-VNTR typing versus IS1311 RFLP typing. As was observed previously (19), two main groups could easily be distinguished by IS1311 RFLP (Fig. 1): one group comprising the 35 *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *silvaticum* strains of our set presenting simple double-band patterns and another group comprising the 82 *M. avium* subsp. *hominissuis* strains of our collection with multiband patterns. In addition, the 31 *M. avium* subsp. *avium* isolates formed a single large cluster (named cluster J) with identical double-band patterns, which was distinct from the double-band pattern (cluster K) shared by the 4 *M. avium* subsp. *silvaticum* isolates. In contrast, within the group of *M. avium* subsp. *hominissuis* strains, only one large cluster (cluster E) of 16 isolates was observed, whereas clusters of no more than 2 strains (clusters A to D and F to I) were otherwise found.

The four strains of *M. avium* subsp. *silvaticum* were identically clustered by IS1311 RFLP and MIRU-VNTR typing into patterns K and 99, respectively (Fig. 1). Five other small IS1311 RFLP clusters (clusters A, C, D, F, H, and I), including *M. avium* subsp. *hominissuis* strains, were concordantly matched by MIRU-VNTR clusters.

Only two small *M. avium* subsp. *hominissuis* IS1311 RFLP clusters (clusters B and G) were subdivided by MIRU-VNTR loci, and in each case this was only by an SLV. Likewise, large IS1311 RFLP cluster E was subdivided into two MIRU-VNTR types, INMV patterns 43 and 51, that differed only by an SLV. In contrast, cluster J, which included the 31 *M. avium* subsp. *avium* isolates, was divided into eight MIRU-VNTR types (INMV patterns 44, 67, 88, 89, 90, 100, 101, and 106) that differed by one to three loci.

Conversely, the main MIRU-VNTR clusters, corresponding to INMV patterns 51 and 43 patterns, were divided by IS1311 RFLP into 21 and 9 different profiles, respectively. Some other smaller clusters were likewise subdivided: INMV patterns 53 and 107 into four profiles, INMV 97 and 42 into three profiles, and 110 into two profiles (see Table S1 in the supplemental material).

Discrimination indexes were calculated for each typing method and for the two methods in combination for the strain collection as a whole and for each subspecies individually (Table 2). Each method separately provided very similar discrimination indexes (Table 2) for the total collection (0.885 for MIRU-VNTR versus 0.912 for IS1311 RFLP). The slightly better resolution power of IS1311 RFLP was explained by the better performance of IS1311 RFLP with *M. avium* subsp. *hominissuis* (0.961 versus 0.807 for MIRU-VNTR), which was better represented in this strain collection. This difference was therefore only partly compensated for by the clearly superior discriminatory power of MIRU-VNTR typing among *M. avium* subsp. *avium* strains (0.723 versus 0 for IS1311 RFLP). As a result of the ability of each method to subdivide some of the clusters defined by the other method, use of the combination of IS1311 RFLP and MIRU-VNTR gave maximal resolution power for the overall strain collection. However, this additive effect was smaller when only *M. avium* subsp. *hominissuis* was considered, as a result of the less frequent cross-subdivision of clusters obtained by the two methods for this taxon (see above).

Phylogeny and host preference analysis. As it provides a high resolution power and is based on multiple independent markers, MIRU-VNTR typing is especially suitable for analysis of clonal complexes and phylogenetic groupings in closely related subspecies when the minimum-spanning-tree approach is used (Fig. 2). Two consistent MIRU-VNTR-based complexes were clearly identified and distinguished (complexes B and C in Fig. 2) among the *M. avium* isolates, completely separating IS901-negative strains considered to be *M. avium* subsp. *hominissuis* (dark gray) and IS901-positive strains considered to be *M. avium* subsp. *avium* or *M. avium* subsp. *silvaticum* (light gray). The *M. avium* subsp. *hominissuis* complex

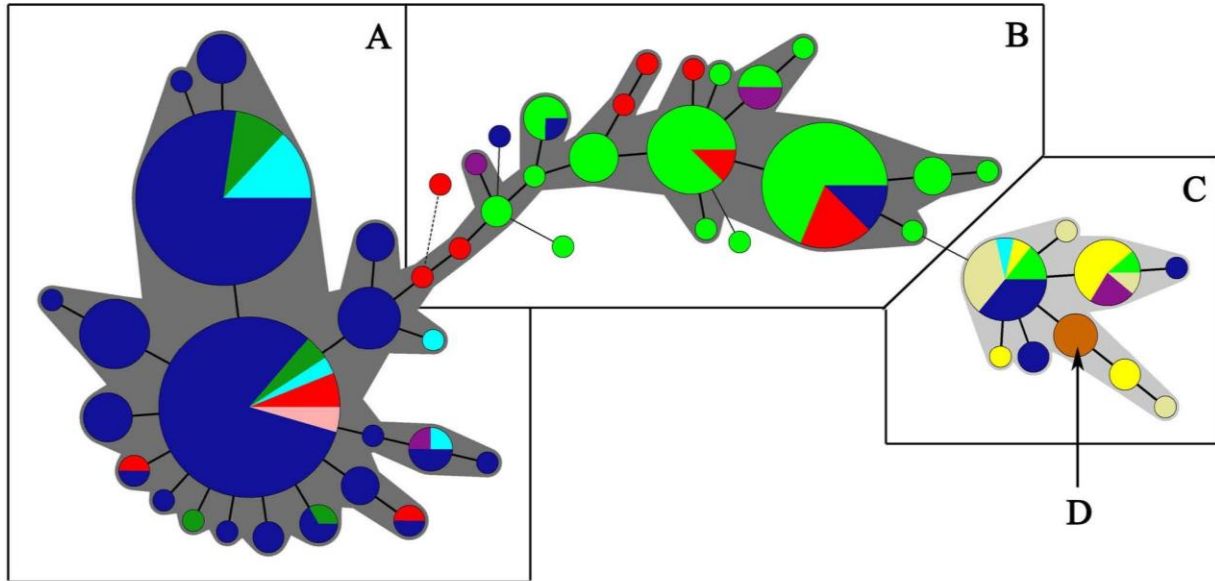


FIG. 2. Minimum spanning tree based on MIRU-VNTR typing results for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (A), *M. avium* subsp. *hominissuis* (B), *M. avium* subsp. *avium* (C), and *M. avium* subsp. *silvaticum* (D) isolates. Circles correspond to the different patterns identified by this method among 183 isolates from the study of Thibault et al. (38) (A) and 117 isolates from this study (B, C, and D); circle sizes are proportional to the numbers of isolates sharing an identical pattern. Strains were isolated from pigs (light green), cattle (dark blue), humans (red), poultry (white), birds (yellow), wood pigeons (brown), goats (light blue), sheep (pink), deer (dark green), and other sources (wild animals, a kangaroo, a soil sample, a cat, and a rabbit) (purple). Gray zones include MIRU-VNTR patterns with SLVs, corresponding to *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *hominissuis* (dark gray) and *M. avium* subsp. *avium*/*M. avium* subsp. *silvaticum* (light gray). Linkages by SLV, double-locus, and triple-locus variations are indicated with thick lines, thin lines, and dotted lines, respectively.

was mostly composed of pig strains but also comprised the totality of human strains. The other complex, that of *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *silvaticum*, included all the bird isolates. Within each complex, no correlation between genotype groupings and host origin or clinical status was observed among the human isolates.

Furthermore, these two *M. avium* complexes were also separated from the complex that comprised the MIRU-VNTR genotypes of the 183 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolates (Fig. 2, complex A). This *M. avium* subsp. *paratuberculosis* branch mainly includes cattle isolates, as a result of their abundance in the corresponding strain collection (38).

DISCUSSION

The subspecies division of *M. avium* has been studied by molecular typing techniques, such as by the identification and analysis of subspecies-associated insertion elements (45) and MLSA based on gene sequence variation (43, 44). In the present study, we used a large set of *M. avium* isolates from different sources, including humans, pigs, and cattle, as well as rarely studied isolates from birds, poultry, and wood pigeons, to evaluate the relevance of the MIRU-VNTR markers, initially identified in *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (38), in order to (i) distinguish strains of the different subspecies, (ii) examine the genetic consistency of taxonomic separations, and (iii) analyze the correlation between genotype and host origin.

Interestingly, all the strains in the *M. avium* panel used in the present study were fully typeable by the use of these eight

MIRU-VNTR markers when the same set of primers designed on the basis of the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* genomic sequence was used. This observation points to both the important genetic conservation among the *M. avium* subspecies, in line with previous evidence (43), and the general applicability of these MIRU-VNTR markers for the whole *M. avium* species.

To evaluate the resolution power of the MIRU-VNTR markers, IS1311 RFLP instead of IS1245 RFLP was used as a reference method, because the former RFLP technique provides more easily interpretable patterns (especially for *M. avium* subsp. *hominissuis*) and has discriminatory power almost equal to that of the latter one (19, 20). MIRU-VNTR and IS1311 RFLP typing overall provided very similar discrimination indexes for the total collection, but the maximal resolution power for the total strain collection was obtained by using the combination of both methods. Whereas IS1311 RFLP typing offered the better resolution of *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates, only MIRU-VNTR typing was capable of discriminating *M. avium* subsp. *avium* strains. In the latter case, the corresponding large IS1311 RFLP cluster (cluster J) was subdivided by one to three MIRU-VNTR markers, while three other IS1311 RFLP clusters in the rest of the collection were subdivided by SLVs. The other six RFLP clusters were fully matched by MIRU-VNTR clusters. Although it was not possible to test the clonal stability of the MIRU-VNTR markers with this set of *M. avium* strains, the same markers were found to be clonally stable among different *M. avium* subsp. *paratu-*

berculosis vaccine batches (38). This suggests that most of the subdivisions of IS1311 RFLP clusters by MIRU-VNTR markers (even by SLVs) are probably epidemiologically meaningful; i.e., they reflect infection by different strains. The same conclusion has been reached for the interpretation of MIRU-VNTR genotypic differences between *M. tuberculosis* isolates, based on the analysis of large sets of epidemiologically well defined strains (33, 35, 46).

Most of the discriminatory power of typing by MIRU-VNTR analysis was clearly concentrated in a few more variable markers, especially at the infrataxon level. Interestingly, however, allelic signatures strictly or strongly associated with subspecies were identified for several MIRU-VNTR markers, including some monomorphic loci within taxons (e.g., alleles 1 and ≥ 2 of marker 25 were restricted to *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *silvaticum* strains and *M. avium* subsp. *hominissuis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains, respectively; alleles 3 and 4 of locus 292 were restricted to most *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains) (Table 2). As a result of this minimal overlap among the allelic distributions between the different subspecies, MIRU-VNTR-based genotype complexes were found to perfectly correlate with the separation of IS901-negative strains considered to be *M. avium* subsp. *hominissuis* and IS901-positive strains considered to be *M. avium* subsp. *avium* or *M. avium* subsp. *silvaticum* (Fig. 2). In turn, these two complexes were perfectly separated from the complex grouping 183 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolates typed with the same MIRU-VNTR markers (38).

MLSA of 56 strains indicated more genetic variability and a more nonclonal population structure in *M. avium* subsp. *hominissuis* than in *M. avium* subsp. *avium*/*M. avium* subsp. *silvaticum* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. The results suggested that *M. avium* subsp. *hominissuis* represents a heterogeneous group of organisms from which the other subspecies have evolved as two independent pathogenic clones (43). The results of MIRU-VNTR-based analysis of our larger collection of 300 isolates (including results published previously [38]) (Fig. 2) are fully consistent with this scenario of independent evolution from a *M. avium* subsp. *hominissuis*-like pool. Within our sampling limits, more variability was also seen among *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates, as reflected by a higher number of independently connected genotypes across the minimum-spanning tree. This contrasts with the common connection of many peripheral, minor genotypes to two central, major genotypes for *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, indicative of some variants arising from only two major clones (corresponding to INMV patterns 1 and 2 [38]). Thus, analysis of a small set of MIRU-VNTR loci, particularly those that are more phylogenetically informative (i.e., with subspecies-specific allelic distributions; see above), is sufficient for obtaining a taxonomic classification equivalent to that obtained by MLSA or other molecular typing methods (19, 20, 43).

Concerning the relevance of distinguishing *M. avium* subsp. *silvaticum* from *M. avium* subsp. *avium* strains (45), we note that both IS1311 RFLP and MIRU-VNTR typing distinguished the corresponding isolates in this panel. However, the variations were very limited, as is the case with MLSA (43). Variations consisted of band positions in a common two-band RFLP pattern and MIRU-VNTR SLVs between the respective strain clusters. A clear limitation is that our strain panel and

that of Turenne et al. (43) included only four and three strains of *M. avium* subsp. *silvaticum*, respectively, revealing the small number of strains described in the literature. Whether *M. avium* subsp. *silvaticum* can be monophyletically distinguished from *M. avium* subsp. *avium* will require analysis of a larger and more representative set of strains.

As for MLSA (43), the *M. avium* subsp. *hominissuis* MIRU-VNTR-based complex included mostly pig and human isolates, but no bird isolates. This is consistent with the notion that *M. avium* subsp. *hominissuis* is an environmental bacterium that specifically causes opportunistic infections in some mammals, such as swine, and immunocompromised or immunocompetent people with some predisposing factors (3, 7, 13, 29). Therefore, the finding of identical genotypes between pig and human isolates, also observed by IS1245 RFLP typing (38), may indicate common sources of infection but does not exclude a potential zoonotic risk of this subspecies. Similarly, the *M. avium* subsp. *avium*/*M. avium* subsp. *silvaticum* MIRU-VNTR-based complex included all the bird isolates but also isolates from other animal species, some of which had the same genotypes as the avian strains. This could also be explained by the ubiquitous environmental distribution of these bird pathogens and/or by host spillover effects (43).

Before molecular typing was developed, the different *M. avium* types within the MAC were defined by serotyping. Thirty-one distinct MAC serovars were established by the presence of surface-located glycopeptidolipids (GPLs) harboring various glycosylation patterns (5). More precisely, serotypes 1 to 6, 8 to 11, 21, and 28 were assigned to *M. avium*, either to *M. avium* subsp. *avium* or *M. avium* subsp. *hominissuis*, while serotypes 7, 12 to 20, and 25 were assigned to *M. intracellulare* (10, 18, 25, 48). Many previous reports describing inter-animal species transmission patterns based on such serotyping data have been published, and environmental distribution studies were done on the basis of such serotyping data. Although it is difficult to compare the results obtained by this technique due to its lack of standardization (9), it would be interesting to analyze the correlation between MIRU-VNTR types and serotypes, in order to capitalize on previous knowledge related to strain, virulence, host preference, and zoonotic risk.

In conclusion, we demonstrated here that MIRU-VNTR markers can be used for the subspecies and infra- and intra-subspecies differentiation of strains of any subspecies of MAC. The technical ease of performance of PCR and the numerical genotype format make this method a very useful additional tool that can be applied as a first-line analysis technique or as a complement to MLSA or classical RFLP methods. In addition to our first report, other reports have described the use of MIRU-VNTR markers for the genotyping of MAC strains (4, 17, 28, 32). In particular, Inagaki et al. described the use of some additional VNTR loci for the typing of a panel of *M. avium* subsp. *hominissuis* strains, but these were only strains of human origin (17). Three of our eight markers, namely, MIRU-VNTR 292, 10, and X3, were also used in one or more of those studies. To facilitate the use of these markers and future comparisons between studies, we recommend that the same primers and allele calling system used in our studies be used (see Table S3 in the supplemental material). As for *Mycobacterium tuberculosis* (35), a consensus-based MIRU-VNTR typing method could thus become the new standard for

refined molecular epidemiological screening, to analyze the origins and transmission patterns of *M. avium* mycobacterioses in human and animal outbreaks.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received support from the Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases (VENoMYC). This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique and Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (contract AIP P00297).

P.S. is a researcher of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

REFERENCES

- Baulard, A., L. Kremer, and C. Locht. 1996. Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *J. Bacteriol.* 178:3091–3098.
- Biet, F., M. L. Boschirol, M. F. Thorel, and L. A. Guilleoteau. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* 36:411–436.
- Bodde, E. E., J. A. Cunningham, P. Della-Latta, N. W. Schluger, and L. Saiman. 2008. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. *Emerg. Infect. Dis.* 14:390–396.
- Bull, T. J., K. Sidi-Boumedine, E. J. McMinn, K. Stevenson, R. Pickup, and J. Hermon-Taylor. 2003. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Cell. Probes* 17:157–164.
- Chatterjee, D., and K. H. Khoo. 2001. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:2018–2042.
- Cocito, C., P. Gilot, M. Coene, M. de Kesel, P. Poupard, and P. Vannuffel. 1994. *Paratuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:328–345.
- Dailoux, M., M. L. Abalain, C. Laurain, L. Lebrun, C. Loos-Ayav, A. Lozniewski, and J. Maugein. 2006. Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. *Eur. Respir. J.* 28:1211–1215.
- David, H., V. Lévy-Frebault, and M. F. Thorel. 1989. Isolement des mycobactéries à partir de produits pathologiques d'origine humaine et animale, p. 29–43. In *Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique*. Commission des Laboratoires de Référence et d'Expertise, Institut Pasteur, Paris, France.
- Dvorska, L., M. Bartos, O. Ostadal, J. Kaustova, L. Matlova, and I. Pavlik. 2002. IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient. *J. Clin. Microbiol.* 40:3712–3719.
- Dvorska, L., L. Matlova, M. Bartos, I. Parmova, J. Bartl, P. Svastova, J. T. Bull, and I. Pavlik. 2004. Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Vet. Microbiol.* 99:239–250.
- Falkinham, J. O. 2004. Environmental sources of *Mycobacterium avium* linked to routes of exposure, p. 26–38. In S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour, and J. Cotruvo (ed.), *Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management*. IWA Publishing, London, United Kingdom.
- Falkinham, J. O. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:177–215.
- Field, S. K., D. Fisher, and R. L. Cowie. 2004. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest* 126:566–581.
- Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144:1189–1196.
- Guerrero, C., C. Bernasconi, D. Burki, T. Bodmer, and A. Telenti. 1995. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 33:304–307.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26:2465–2466.
- Inagaki, T., K. Nishimori, T. Yagi, K. Ichikawa, M. Moriyama, T. Nakagawa, T. Shibayama, K. Uchiya, T. Nikai, and K. Ogawa. 2009. Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 47:2156–2164.
- Inderlied, C. B., C. A. Kemper, and L. M. Bermudez. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:266–310.
- Johansen, T. B., B. Dønne, M. R. Jensen, and I. Olsen. 2005. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *J. Clin. Microbiol.* 43:2500–2502.
- Johansen, T. B., I. Olsen, M. R. Jensen, U. R. Dahle, G. Holstad, and B. Dønne. 2007. New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiol.* 7:1–9.
- Kunze, Z. M., F. Portaels, and J. J. McFadden. 1992. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.* 30:2366–2372.
- Kunze, Z. M., S. Wall, R. Appelberg, M. T. Silva, F. Portaels, and J. J. McFadden. 1991. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 5:2265–2272.
- Matlova, L., L. Dvorska, W. Y. Ayele, M. Bartos, T. Anemori, and I. Pavlik. 2005. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *J. Clin. Microbiol.* 43:1261–1268.
- Matlova, L., L. Dvorska, K. Palecek, L. Maurenc, M. Bartos, and I. Pavlik. 2004. Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 isolates from pigs and environments. *Vet. Microbiol.* 102:227–236.
- Mijs, W., P. de Haas, R. Rossau, T. van der Laan, L. Rigouts, F. Portaels, and D. van Soolingen. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1505–1518.
- Möbius, P., P. Lentzsch, I. Moser, L. Naumann, G. Martin, and H. Köhler. 2006. Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Vet. Microbiol.* 117:284–291.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590.
- Overduin, P., L. Schouls, P. Roholl, A. van der Zanden, N. Mahmood, A. Herrewegh, and D. van Soolingen. 2004. Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 42:5022–5028.
- Parrish, S. C., J. Myers, and A. Lazarus. 2008. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections in non-HIV patients. *Postgrad. Med.* 120:78–86.
- Pavlik, I., P. Svastova, J. Bartl, L. Dvorska, and I. Rychlik. 2000. Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:212–217.
- Picardeau, M., A. Varnerot, T. Lecompte, F. Brel, T. May, and V. Vincent. 1997. Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 35:2503–2510.
- Romano, M. L., A. Amadio, F. Bigi, L. Klepp, I. Etchehoury, M. N. Llana, C. Morsella, F. Paolicchi, I. Pavlik, M. Bartos, S. C. Leão, and A. Cataldi. 2005. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet. Microbiol.* 110:221–237.
- Savine, E., R. M. Warren, G. D. van der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, C. Locht, and P. Supply. 2002. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40:4561–4566.
- Skuce, R. A., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. Glyn Hewinson, and S. D. Neill. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148:519–528.
- Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rüsch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44:4498–4510.
- Supply, P., J. Magdalena, S. Himpens, and C. Locht. 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol. Microbiol.* 26:991–1003.
- Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36:762–771.
- Thibault, V. C., M. Grayon, M. L. Boschirol, C. Hubbans, P. Overduin, K. Stevenson, M. C. Gutierrez, P. Supply, and F. Biet. 2007. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 45:2404–2410.
- Thibault, V. C., M. Grayon, M. L. Boschirol, E. Willery, C. Allix-Béguec, K. Stevenson, F. Biet, and P. Supply. 2008. Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-num-

- ber tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **46**:4091–4094.
40. Thorel, M. F., H. Huchzermeyer, R. Weiss, and J. J. Fontaine. 1997. *Mycobacterium avium* infections in animals. *Vet. Res.* **28**:439–447.
 41. Thorel, M. F., M. Krichevsky, and V. V. Lévy-Frébault. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:254–260.
 42. Tirkkonen, T., J. Pakarinen, A. M. Moisander, J. Mäkinen, H. Soini, and T. Ali-Vehmas. 2007. High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative *IS1245* RFLP analysis. *Vet. Microbiol.* **125**:175–181.
 43. Turenne, C. Y., D. M. Collins, D. C. Alexander, and M. A. Behr. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *J. Bacteriol.* **190**:2479–2487.
 44. Turenne, C. Y., M. Semret, D. V. Cousins, D. M. Collins, and M. A. Behr. 2006. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* **44**:433–440.
 45. Turenne, C. Y., R. J. Wallace, and M. A. Behr. 2007. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:205–229.
 46. van Deutekom, H., P. Supply, P. E. W. de Haas, E. Willery, S. P. Hoijing, C. Locht, R. A. Coutinho, and D. van Soolingen. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4473–4479.
 47. van Soolingen, D., J. Bauer, V. Ritacco, S. L. O. Cardoso, I. Pavlik, V. Vincent, N. Rastogi, A. Gori, T. Bodmer, C. Garzelli, and M. J. Garcia. 1998. *IS1245* restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3051–3054.
 48. Wayne, L. G., R. C. Good, A. Tsang, R. Butler, D. Dawson, D. Groothuis, W. Gross, J. Hawkins, J. Kilburn, M. Kubin, K. H. Schröder, V. A. Silcox, C. Smith, M. F. Thorel, C. Woodley, and M. A. Yakus. 1993. Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:482–489.

Table S1. *M. avium* strains used and results for IS1311 RFLP and MIRU-VNTR typing

Strain reference	Host origin	<i>M. avium</i> subsp.	Pattern INMV	N° of TR at 8 loci 292-X3-25-47-3-7-10-32	IS901	IS1311 RFLP pattern
1998.10685.00	bird	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
1999.05332.00	bird	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2002.02273.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2002.07624.00	pig	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2003.03446.00	bird	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2005.01657.00	wild animal	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2005.03421.00	bird	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2006.00158.00	bird	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2006.00633.00	cat	<i>avium</i>	INMV 67	23131127	+	J
2003.02072.00	bird	<i>avium</i>	INMV 88	21131117	+	J
2004.02968.00	bird	<i>avium</i>	INMV 88	21131117	+	J
2002.07730.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 89	21131118	+	J
2003.05122.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 90	22131127	+	J
2005.03465.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 90	22131127	+	J
2002.08069.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 44	23121127	+	J
1997.11671.00	pig	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2000.03751.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2001.01064.01	caprin	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2002.01120.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2002.04186.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2003.01461.00	pig	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2003.03646.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2003.03969.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2003.05476.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2003.05477.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2005.02624.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2005.03056.00	bird	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2005.03223.00	bovin	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2006.01415.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 100	24131127	+	J
2005.04156.00	bird	<i>avium</i>	INMV 101	24131137	+	J
1997.12641.00	poultry	<i>avium</i>	INMV 106	25131127	+	J
2007.1258	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV 18	25221129	-	*
2000.09692.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 83	-3221128	-	*
1995.08166.01	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 53	-5321128	-	*
1995.08610.03	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 53	-5321128	-	*
1996.12939.01	bovin	<i>hominissuis</i>	INMV 53	-5321128	-	*
1998.08379.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 53	-5321128	-	*
2007.1255	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV 87	12431158	-	*
1995.08166.02	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 91	22221127	-	*
2007.1266	human (HIV+)	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	*
2007.1267	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	*
1995.06877.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	*
1995.09002.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	G
1996.06129.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	*
1996.08209.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	*
1997.02827.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	H
1997.10518.01	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	G
2002.08180.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	E
2004.02966.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	E
2004.02967.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	E
2006.00974.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	E
2006.01317.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	E
2006.01318.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	E
2006.01396.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	A
2007.00289.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 43	22221128	-	E
1999.06102.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 46	22221129	-	*
2007.1253	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV 94	22221158	-	*
1996.09691.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV 57	22231118	-	*

1999.03873.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	97	23221128	-	B
1999.06686.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	97	23221128	-	B
2006.00890.00	kangaroo	<i>hominissuis</i>	INMV	97	23221128	-	*
2006.01015.00	wild animal	<i>hominissuis</i>	INMV	97	23221128	-	A
2007.00624.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	98	23331158	-	*
1995.01088.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	42	24221125	-	*
1996.09689.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	42	24221125	-	*
2003.05567.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	42	24221125	-	*
2007.1260	human (HIV+)	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2007.1261	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	D
2007.1268	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2007.1269	human (HIV+)	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	C
2007.1271	human (HIV+)	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2007.3344	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	C
1995.02051.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
1995.04875.03	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
1996.06520.00	bovin	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
1996.06561.00	bovin	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
1996.12939.02	bovin	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	H
1997.05652.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
1998.08286.01	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
1999.05060.00	bovin	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
1999.06477.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
1999.09203.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
2000.03106.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
2000.05379.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2002.04540.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2002.05124.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
2005.01841.02	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2005.02625.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2005.02747.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	D
2005.03470.01	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
2005.03636.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	F
2005.03637.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	F
2005.03764.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2006.01319.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
2006.01320.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2006.01483.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
2007.00346.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	*
2007.00825.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	-	E
1999.02794.02	Soil sample	<i>hominissuis</i>	INMV	104	-5331128	-	*
2002.05579.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	105	24231128	-	*
1995.07826.03	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	107	25221128	-	*
1999.09152.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	107	25221128	-	*
2007.00128.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	107	25221128	-	I
2007.00156.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	107	25221128	-	I
2007.00512.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	107	25221128	-	*
2007.1252	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV	108	25221159	-	*
1999.05289.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	109	25321128	-	*
2002.07886.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	110	25331128	-	*
2003.00028.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	110	25331128	-	*
1997.07613.00	pig	<i>hominissuis</i>	INMV	111	27221125	-	*
2000.05848.00	bovin	<i>hominissuis</i>	INMV	112	35331138	-	*
2007.1265	human (HIV-)	<i>hominissuis</i>	INMV	115	22331128	-	*
2007.1270	human (HIV+)	<i>hominissuis</i>	INMV	120	32331128	-	*
1978.06409	wood pigeon	<i>silvaticum</i>	INMV	99	24131117	+	K
1983.00853	wood pigeon	<i>silvaticum</i>	INMV	99	24131117	+	K
2006.00404.00	wood pigeon	<i>silvaticum</i>	INMV	99	24131117	+	K
2006.00869.00	wood pigeon	<i>silvaticum</i>	INMV	99	24131117	+	K

* unique pattern, - PCR product not detected.

Table S2. Frequencies of *M. avium* MIRU-VNTR types in this study.

<i>M. avium</i> subsp.	Pattern INMV		N° of TRs at <i>locus</i> 292-X3-25-47-3-7-10-32	N° of isolates
<i>hominissuis</i>	INMV	51	24221128	32
<i>hominissuis</i>	INMV	43	22221128	16
<i>avium</i>	INMV	100	24131127	14
<i>avium</i>	INMV	67	23131127	9
<i>hominissuis</i>	INMV	107	25221128	5
<i>hominissuis</i>	INMV	53	-5321128	4
<i>hominissuis</i>	INMV	97	23221128	4
<i>silvaticum</i>	INMV	99	24131117	4
<i>hominissuis</i>	INMV	42	24221125	3
<i>avium</i>	INMV	88	21131117	3
<i>avium</i>	INMV	90	22131127	2
<i>hominissuis</i>	INMV	110	25331128	2
<i>hominissuis</i>	INMV	18	25221129	1
<i>avium</i>	INMV	44	23121127	1
<i>hominissuis</i>	INMV	46	22221129	1
<i>hominissuis</i>	INMV	57	22231118	1
<i>hominissuis</i>	INMV	83	-3221128	1
<i>hominissuis</i>	INMV	87	12431158	1
<i>avium</i>	INMV	89	21131118	1
<i>hominissuis</i>	INMV	91	22221127	1
<i>hominissuis</i>	INMV	94	22221158	1
<i>hominissuis</i>	INMV	98	23331158	1
<i>avium</i>	INMV	101	24131137	1
<i>hominissuis</i>	INMV	104	-5331128	1
<i>hominissuis</i>	INMV	105	24231128	1
<i>avium</i>	INMV	106	25131127	1
<i>hominissuis</i>	INMV	108	25221159	1
<i>hominissuis</i>	INMV	109	25321128	1
<i>hominissuis</i>	INMV	111	27221125	1
<i>hominissuis</i>	INMV	112	35331138	1
<i>hominissuis</i>	INMV	115	22331128	1
<i>hominissuis</i>	INMV	120	32331128	1

gray lines: patterns matching those already identified for *M. avium* strains in the study of Thibault *et al.* (38), -: PCR product not detected

Table S3. Foreseeable PCR product size (bp) of MIRU-VNTR *loci*

Measured element	Number of TR (n)	Foreseeable PCR product size (bp) for each MIRU-VNTR <i>locus</i>							
		292	X3	25	47	3	7	10	32
PCR product (a) ^a	0	141	94	176	112	154	159	193	154
	1	194	147	234	147	181	181	248	172
	2	247	200	292	182	208	203	303	190
	3	300	253	350	217	235	225	358	208
	4	353	306	408	252	262	247	413	226
	5	406	359	466	287	289	269	468	244
	6	459	412	524	322	316	291	523	262
	7	512	465	582	357	343	313	578	280
	8	565	518	640	392	370	335	633	298
	9	618	571	698	427	397	357	688	316
	10	671	624	756	462	424	379	743	334
	11	724	677	814	497	451	401	798	352
	12	777	730	872	532	478	423	853	370
Repeat unit size ^b (b)	1	53	53	58	35	27	22	55	18
Flanking region size ^b (c)	0	141	94	176	112	154	159	193	154

^a $a = (b \times n) + c$

^b calculated from *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K10 genome

Annexe 2 : Mise à jour de l'historique des descriptions de nouvelles espèces mycobactériennes (Kazda 2009), tuberculeuses ^(T), lépreuses ^(L) ou non-tuberculeuses ^(N), à croissance rapide ^(R), intermédiaire ^(I) ou lente ^(S), et validées ^(V) dans la dernière liste des noms bactériens approuvés (Skerman *et al.* 1989), proposées pour validation ^(P), ou décrites non formellement ^(D)

Année	Espèce (complexe)	Ensemble	Croissance	Statut	Origine	Référence
1873	<i>M. leprae</i>	L	S	V	Humains	(Hansen 1880)
1882	<i>M. tuberculosis</i> (MTC)	T	S	V	Humains	(Zopf 1883)
1889	<i>M. smegmatis</i>	N	R	V	Environnement	(Trevisan 1889a)
1891	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> (MAC)	N	S	V	Oiseaux	(Thorel <i>et al.</i> 1990)
1895	<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAC)	N	S	V	Bovins	(Thorel <i>et al.</i> 1990)
1896	<i>M. bovis</i> (MTC)	T	S	V	Bovins	(Karlson et Lessel 1970)
1899	<i>M. phlei</i>	N	R	V	Environnement	(Lehmann et Neuman 1899b)
1903	<i>M. chelonae</i>	N	R	V	Poikilothermes	(Bergey <i>et al.</i> 1923)
1912	<i>M. aquae</i> / <i>M. gordonae</i>	N	S	V	Environnement	(Bojalil <i>et al.</i> 1962)
	<i>M. lepraemurium</i>	L	S	V	Souris	(Marchoux et Sorel 1912)
1926	<i>M. marinum</i>	N	S	V	Poissons	(Aronson 1926)
1927	<i>M. microti</i> (MTC)	T	S	V	Animaux	(Reed 1957)
1938	<i>M. fortuitum</i> ssp. <i>fortuitum</i> (MFC)	N	R	V	Poikilothermes	(Da Costa Cruz 1938)
1949	<i>M. intracellulare</i> (MAC)	N	S	V	Humains	(Cuttino et McCabe 1949)
1950	<i>M. ulcerans</i>	N	S	V	Humains	(MacCallum <i>et al.</i> 1950)
1953	<i>M. abscessus</i>	N	R	V	Humains	(Moore et Frerichs 1953)
1955	<i>M. kansasii</i>	N	S	V	Humains	(Hauduroy 1955)
1956	<i>M. scrofulaceum</i>	N	S	V	Humains	(Prissick et Masson 1956)
	<i>M. paraffinicum</i>	N	S	P	Environnement	(Davis <i>et al.</i> 1956)
1958	<i>M. farcinogenes</i>	N	S	V	Animaux	(Chamoiseau 1973)
1959	<i>M. xenopi</i>	N	S	V	Poikilothermes	(Schwabacher 1959)
1960	<i>M. salmoniphilum</i>	N	R	P	Poissons	(Ross 1960)
1962	<i>M. flavescens</i>	N	R	V	Environnement	(Bojalil <i>et al.</i> 1962)
	<i>M. peregrinum</i> (MFC)	N	R	P	Humains	(Kusunoki et Ezaki 1992)
	<i>M. fortuitum</i> ssp. <i>acetamidolyticum</i> (MFC)	N	R	P	Humains	(Kusunoki et Ezaki 1992)
1964	<i>M. vaccae</i>	N	R	V	Environnement	(Bonicke et Juhasz 1964)
1965	<i>M. simiae</i>	N	S	V	Animaux	(Karssova <i>et al.</i> 1965)
	<i>M. diernhoferi</i> (MPC)	N	R	P	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1983c)
	<i>M. nonchromogenicum</i> (MtC)	N	S	V	Environnement	(Tsukamura 1965)
	<i>M. parafortuitum</i> (MPC)	N	R	V	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1965)
1966	<i>M. terrae</i> (MtC)	N	S	V	Environnement	(Wayne 1966)
	<i>M. gastri</i>	N	S	V	Humains	(Wayne 1966)
	<i>M. triviale</i> (MtC)	N	S	V	Humains	(Kubica <i>et al.</i> 1970)
	<i>M. aurum</i>	N	R	V	Environnement	(Tsukamura 1966)
	<i>M. thermoresistibile</i>	N	R	V	Environnement	(Tsukamura 1966)
1967	<i>M. chitae</i>	N	R	V	Environnement	(Tsukamura 1967)
1969	<i>M. africanum</i> (MTC)	T	S	V	Humains	(Tsukamura <i>et al.</i> 1983c)
1971	<i>M. agri</i>	N	R	P	Environnement	(Tsukamura 1981)
	<i>M. asiaticum</i>	N	S	V	Humains	(Weiszfeiler <i>et al.</i> 1971)
	<i>M. duvalii</i>	N	R	V	Humains	(Stanford et Gunthorpe 1971)
	<i>M. gadium</i>	N	R	V	Humains	(Casal et Calero 1974)
	<i>M. gilvum</i>	N	R	V	Humains	(Stanford et Gunthorpe 1971)
	<i>M. obuense</i>	N	R	P	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1981)
	<i>M. rhodesiae</i>	N	R	P	Humains et environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1981)
1972	<i>M. neoaurum</i>	N	R	V	Environnement	(Tsukamura 1966)
	<i>M. szulgai</i>	N	S	V	Humains	(Marks <i>et al.</i> 1972)
1973	<i>M. aichiense</i>	N	R	P	Humains et environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1981)
	<i>M. chubuense</i>	N	R	P	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1981)
	<i>M. senegalense</i>	N	R	V	Animaux	(Chamoiseau 1973)
	<i>M. tokaiense</i>	N	R	P	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1981)

Année	Espèce (complexe)	Ensemble	Croissance	Statut	Origine	Référence
1975	<i>M. shimoidei</i>	N	S	P	Humains	(Tsukamura 1982)
	<i>M. petroleophilum</i>	N	R	P	Environnement	(Simmon <i>et al.</i> 2009)
1977	<i>M. malmoense</i>	N	S	V	Humains	(Schroder et Juhlin 1977)
1978	<i>M. haemophilum</i>	N	S	V	Humains	(Sompolinsky <i>et al.</i> 1978)
1979	<i>M. komossense</i>	N	R	V	Environnement	(Kazda et Muller 1979)
1980	<i>M. sphagni</i>	N	R	P	Environnement	(Kazda 1980)
1983	<i>M. fallax</i>	N	R	P	Environnement	(Lévy-Frébault <i>et al.</i> 1983)
	<i>M. porcinum</i>	N	R	P	Animaux	(Tsukamura <i>et al.</i> 1983b)
	<i>M. austroafricanum</i> (MPC)	N	R	P	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1983c)
	<i>M. pulveris</i>	N	I	P	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1983a)
1986	<i>M. moriokaense</i>	N	R	P	Environnement	(Tsukamura <i>et al.</i> 1986)
	<i>M. chlorophenolicum</i>	N	R	P	Environnement	(Häggbloom <i>et al.</i> 1994)
1987	<i>M. poriferae</i>	N	R	P	Environnement	(Padgitt et Moshier 1987)
1990	<i>M. cookii</i>	N	S	P	Environnement	(Kazda <i>et al.</i> 1990)
	<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> (MAC)	N	S	P	Oiseaux	(Thorel <i>et al.</i> 1990)
1992	<i>M. alvei</i>	N	R	P	Environnement	(Ausina <i>et al.</i> 1992)
	<i>M. madagascariense</i>	N	R	P	Environnement	(Kazda <i>et al.</i> 1992)
1992	<i>M. confluentis</i>	N	R	P	Humains	(Kirschner <i>et al.</i> 1992)
1993	<i>M. hiberniae</i>	N	S	P	Environnement	(Kazda <i>et al.</i> 1993)
	<i>M. brumae</i>	N	R	P	Environnement	(Luquin <i>et al.</i> 1993)
	<i>M. celatum</i>	N	S	P	Humains	(Butler <i>et al.</i> 1993)
	<i>M. genavense</i>	N	S	P	Humains	(Böttger <i>et al.</i> 1993)
	<i>M. intermedium</i>	N	S	P	Humains	(Meier <i>et al.</i> 1993)
	<i>M. interjectum</i>	N	S	P	Humains	(Springer <i>et al.</i> 1993)
	<i>M. mucogenicum</i>	N	R	P	Humains	(Springer <i>et al.</i> 1995a)
	<i>M. branderi</i>	N	S	P	Humains	(Koukila-Kähkölä <i>et al.</i> 1995)
1996	<i>M. conspicuum</i>	N	S	P	Humains	(Springer <i>et al.</i> 1995b)
	<i>M. hodleri</i>	N	R	P	Environnement	(Kleespies <i>et al.</i> 1996)
	<i>M. lentiflavum</i>	N	S	P	Humains	(Springer <i>et al.</i> 1996)
1997	<i>M. triplex</i>	N	S	P	Humains	(Floyd <i>et al.</i> 1996)
	<i>M. mageritense</i>	N	S	P	Humains	(Domenech <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. heidelbergense</i>	N	S	P	Humains	(Haas <i>et al.</i> 1997)
1998	<i>M. hassiacum</i>	N	R	P	Humains et environnement	(Schröder <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. novocastrense</i>	N	R	P	Humains	(Shojaei <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. canettii</i> (MTC)	T	S	P	Humains	(van Soelingen <i>et al.</i> 1997)
	<i>M. anthracenicum</i>	N	R	D	Environnement	(Wang <i>et al.</i> 1998)
	<i>M. isoniacini</i>	N	R	D	Environnement	(Boettger 1997)
1998	<i>M. bohemicum</i>	N	S	P	Humains et environnement	(Reischl <i>et al.</i> 1998a)
1999	<i>M. tusciae</i>	N	S	P	Humains et environnement	(Tortoli <i>et al.</i> 1999)
	<i>M. wolinskyi</i>	N	R	P	Humains	(Brown <i>et al.</i> 1999)
	<i>M. caprae</i> (MTC)	T	S	P	Animaux	(Aranaz <i>et al.</i> 2003)
	<i>M. murale</i>	N	R	P	Environnement	(Vuorio <i>et al.</i> 1999)
	<i>M. goodii</i>	N	R	P	Humains	(Brown <i>et al.</i> 1999)
2000	<i>M. kubicae</i>	N	S	P	Humains	(Floyd <i>et al.</i> 1996)
	<i>M. elephantis</i>	N	R	P	Animaux et humains	(Shojaei <i>et al.</i> 2000)
	<i>M. septicum</i>	N	R	P	Humains	(Schinsky <i>et al.</i> 2000)
	<i>M. botniense</i>	N	S	P	Environnement	(Torkko <i>et al.</i> 2000)
2001	<i>M. immunogenum</i>	N	R	P	Humains et environnement	(Wilson <i>et al.</i> 2001)
	<i>M. chesapeaki</i>	N	S	D	Poisson	(Heckert <i>et al.</i> 2001)
	<i>M. doricum</i>	N	R	P	Humains	(Tortoli <i>et al.</i> 2001)
	<i>M. heckeshornense</i>	N	S	P	Humains	(Roth <i>et al.</i> 2000)
2002	<i>M. frederiksbergense</i>	N	R	P	Environnement	(Willumsen <i>et al.</i> 2001)
	<i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> (MAC)	N	S	D	Humains et animaux	(Mijs <i>et al.</i> 2002)
	<i>M. palustre</i>	N	S	P	Humains et environnement	(Torkko <i>et al.</i> 2002)
	<i>M. lacus</i>	N	S	P	Humains et environnement	(Turenne <i>et al.</i> 2002)

Année	Espèce (complexe)	Ensemble			Origine	Référence
		Croissance	Statut			
2002	<i>M. holsaticum</i>	N	R	P	Humains	(Richter <i>et al.</i> 2002)
	<i>M. vanbaalenii</i>	N	R	P	Environnement	(Khan <i>et al.</i> 2002)
	<i>M. visibilis</i>	N	S	D	Animaux	(Appleyard et Clark 2002)
2003	<i>M. shottsii</i>	N	S	P	Environnement	(Rhodes <i>et al.</i> 2003)
	<i>M. pinnipedii</i> (MTC)	T	S	P	Animaux, humains	(Cousins <i>et al.</i> 2003)
	<i>M. montefiorensis</i>	N	S	P	Animaux	(Levi <i>et al.</i> 2003)
2004	<i>M. chimaera</i> (MAC)	N	S	P	Humains	(Tortoli <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. cosmeticum</i>	N	R	P	Humains et environnement	(Cooksey <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. boenickei</i> (MFC, biovar 3)	N	R	P	Humains	(Schinsky <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. brisbanense</i> (MFC, biovar 3)	N	R	P	Humains	(Schinsky <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. canariensis</i>	N	R	P	Humains	(Jiménez <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. houstonense</i> (MFC, biovar 3)	N	R	P	Humains	(Schinsky <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. neworleansense</i> (MFC, biovar 3)	N	R	P	Humains	(Schinsky <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. nebraskense</i>	N	S	P	Humains	(Mohamed <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. parascrofulaceum</i>	N	S	P	Humains	(Turenne <i>et al.</i> 2004a)
	<i>M. parmense</i>	N	S	P	Humains	(Fanti <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. psychrotolerans</i>	N	R	P	Environnement	(Trujillo <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. pyrenivorans</i>	N	R	P	Environnement	(Derz <i>et al.</i> 2004)
	<i>M. saskatchewanense</i>	N	S	P	Humains	(Turenne <i>et al.</i> 2004b)
	<i>M. pseudoshottsii</i>	N	S	P	Animaux	(Rhodes <i>et al.</i> 2005)
	<i>M. florentinum</i>	N	S	P	Humains	(Tortoli <i>et al.</i> 2005)
	2006	<i>M. colombiense</i> (MAC)	N	S	P	Animaux
<i>M. aubagnense</i>		N	S	P	Humains	(Adékambi <i>et al.</i> 2006a)
<i>M. barrassiae</i>		N	R	D	Humains	(Adékambi <i>et al.</i> 2006c)
<i>M. bolletti</i>		N	R	P	Humains	(Adékambi <i>et al.</i> 2006a)
<i>M. phocaicum</i>		N	R	P	Humains	(Adékambi <i>et al.</i> 2006a)
<i>M. arupense</i>		N	R	P	Humains	(Cloud <i>et al.</i> 2006)
<i>M. conceptionense</i>		N	R	P	Humains	(Adékambi <i>et al.</i> 2006e)
<i>M. fluoranthenvivorans</i>		N	R	P	Environnement	(Hormisch <i>et al.</i> 2004)
<i>M. massiliense</i>		N	R	P	Humains	(Adékambi <i>et al.</i> 2004)
<i>M. monacense</i>		N	R	P	Humains	(Reischl <i>et al.</i> 2006)
2007	<i>M. kumamotoense</i>	N	S	P	Humains	(Masaki <i>et al.</i> 2006)
	<i>M. seoulense</i>	N	S	P	Humains	(Mun <i>et al.</i> 2007)
2008	<i>M. arosiense</i>	N	S	P	Humains	(Bang <i>et al.</i> 2008)
	<i>M. llatzerense</i>	N	S	P	Environnement	(Gomila <i>et al.</i> 2008)
	<i>M. senuense</i>	N	S	P	Humains	(Mun <i>et al.</i> 2008)
	<i>M. setense</i>	N	R	P	Humains	(Lamy <i>et al.</i> 2008)
	<i>M. stomatepiaie</i>	N	S	P	Poissons	(Pourahmad <i>et al.</i> 2008)
2009	<i>M. aromaticivorans</i>	N	R	P	Environnement	(Hennessee <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. bouchedurhonense</i> (MAC)	N	S	P	Humains	(Ben Salah <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. crocinum</i>	N	R	P	Environnement	(Hennessee <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. insubricum</i>	N	R	P	Humains	(Tortoli <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. kyorinense</i>	N	S	P	Humains	(Okazaki <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. marseillense</i> (MAC)	N	S	P	Humains	(Ben Salah <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. noviomagense</i>	N	S	P	Humains	(van Ingen <i>et al.</i> 2009b)
	<i>M. pallens</i>	N	R	P	Environnement	(Hennessee <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. riyadhense</i>	N	S	P	Humains	(van Ingen <i>et al.</i> 2009a)
	<i>M. rutilum</i>	N	R	P	Environnement	(Hennessee <i>et al.</i> 2009)
2010	<i>M. rufum</i>	N	R	P	Environnement	(Hennessee <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. timonense</i> (MAC)	N	S	P	Humains	(Ben Salah <i>et al.</i> 2009)
	<i>M. vulneris</i> (MAC)	N	S	P	Humains	(van Ingen <i>et al.</i> 2009c)
	<i>M. paraseoulense</i>	N	S	P	Humains	(Lee <i>et al.</i> 2010b)
	<i>M. paraterrae</i>	N	S	P	Humains	(Lee <i>et al.</i> 2010a)

MAC: *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, MFC: *Mycobacterium fortuitum* complex, MTC: *Mycobacterium tuberculosis* complex, MtC: *Mycobacterium terrae* complex, MPC: *Mycobacterium parafortuitum* complex.

Annexe 3 : Etudes rapportant des cas humains de mycobactérioses ganglionnaires (A), pulmonaires (B), cutanées (C), ou particulières (D), causées ou présumées causées par de l'eau contaminée

Echantillonnage	Origine	Individu	Pathologie	Référence
A	non précisé	plusieurs (résumé)	lymphadénite cervicale	(Primm <i>et al.</i> 2004)
	robinet	Italie et Suisse	ganglions cervicaux	(Tortoli <i>et al.</i> 1999)
	piscine ou bac à sable	Pays Bas (Amsterdam)	lymphadénite cervicale	(Lindeboom <i>et al.</i> 2005)
	non précisé	plusieurs (résumé)	lymphadénite cervicale	(Falkinham 2003b)
	jacuzzi	Non précisé	pneumonie	(Kahana <i>et al.</i> 1997)
	jacuzzi	USA (Scottsdale)	infiltration pulmonaire	(Khoor <i>et al.</i> 2001)
	hôpital	USA (Houston)	troubles pulmonaires	(Zhang <i>et al.</i> 2002)
	aérosol de spa et eau d'air de	plusieurs (résumé)	hypersensibilité pulmonaire	(Falkinham 2003b)
	infiltration de bâtiment	Finlande	immunocompétent	(Jussila <i>et al.</i> 2002)
	aérosol	plusieurs (résumé)	travailleurs et utilisateur de spa	(Primm <i>et al.</i> 2004)
B	eau, sol, tourbe	plusieurs (résumé)	hypersensibilité pulmonaire	(Falkinham 2003a)
	aérosol	USA (Springfield)	personne âgée	(Sood <i>et al.</i> 2007)
	bain de spa	Australie	femme immunocompétente	(Lumb <i>et al.</i> 2004)
	maison de retraite	Canada (Toronto)	adulte immunocompétent	(Marras <i>et al.</i> 2005)
	marais et de système d'irrigation	Australie (Phillip)	homme adulte (50 ans)	(Ross <i>et al.</i> 1997)
	environnement	Finlande (western)	Non précisé	(Torikko <i>et al.</i> 2001)
	bain de pied d'un salon de	USA (Atlanta)	personne âgée (85 ans)	(Gira <i>et al.</i> 2004)
	bain de pied d'un salon de	USA (Californie)	consommateur de pédicure	(Sniezek <i>et al.</i> 2003)
	bain de pied d'un salon de	USA (Californie)	consommateur de pédicure	(Winthrop <i>et al.</i> 2002)
	bain de pied d'un salon de	USA (Californie)	consommateur de pédicure	(Vugia <i>et al.</i> 2005)
C	piscine	Chine (Pékin)	infection cutanée	(Cai <i>et al.</i> 2006)
	aquarium de poisson Beta	USA (New York)	utilisateur de piscine (17-27 ans)	(Cassetty et Sanchez 2004)
	environnement	Australie (Phillip)	homme adulte (49 ans)	(Stinear <i>et al.</i> 2000)
	rivière	UK (Cardiff)	population locale	(Pickup <i>et al.</i> 2005)
	rivière	France (Marseille)	population locale	(Adékambi <i>et al.</i> 2006)
	aérosol, eau potable, sol	plusieurs (résumé)	femme adulte (31 ans)	(Falkinham 2003b)
	chirurgie par laparoscopie	Inde (Kadnataka)	patient HIV+	(Rajini <i>et al.</i> 2007)
			femme adulte (35 ans)	
				infection postopératoire

Annexe 4 : Classification de Runyon (Euzéby 2010)

Groupe	Caractéristiques à 37°C des souches jeunes
I	Photochromogène : pigmentation de la souche uniquement à la lumière
II	Scotochromogène : pigmentation de la souche à la lumière et à l'obscurité
III	Achromogène : la souche reste non pigmenté à la lumière et à l'obscurité
IV	Mycobactéries à croissance rapide (inférieure à 8 jours à 37°C)

Annexe 5 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe I de Runyon (Euzéby 2010)

	Aspect d'une colonie sur Löwenstein-Jensen	Temps de croissance	Croissance à 30°C	Croissance à 37°C	Niacine	Nitrate réductase	Uréase	Hydrolyse du tween en 10 jours	Phosphatase acide	Arylsulfatase à 14 jours	β-galactosidase	Thiosemicarbazone à 10 mg/l
<i>asiaticum</i>	D, L	21 j	+	+	-	-	-	+	+	+	-	R
<i>intermedium</i>	E, L	14 j	+	+	-	-	V	+	+	+	+	ND
<i>kansasii</i>	E, U, L	14 j	+	+	-	+	V	+	+	V	-	S
<i>marinum</i>	E, L	8 j	+	-	-	-	+	+	+	+	-	R
<i>simiae</i>	D, L	21 j	+	+	V	-	+	-	-	-	-	R

E: eugonique; D: dysgonique; L: lisse; U: rugueuse; S: sensible; R: résistante; ND: non décrit ; V: variable.

Annexe 6 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe II de Runyon (Euzéby 2010)

	Aspect d'une colonie sur Löwenstein-Jensen	Croissance à 37°C	Croissance à 22°C	Croissance à 42°C	Croissance à 45°C	Croissance sur gélose ordinaire	Nitrate réductase	Uréase	Arylsulfatase à 3 jours	Hydrolyse du tween en 10 jours	Phosphatase acide	β-galactosidase	Croissance à 5 % de NaCl	Thiosemicarbazone à 10 mg/l
<i>interjectum</i>	L	28 j	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	R
<i>flavescens</i>	U	10 j	+	-	-	+	+	V	+	+	-	-	+	R
<i>gordonae</i>	L	14 j	+	-	-	-	-	V	-	+	V	-	-	R
<i>keckeshornense</i>	L	28j	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>lentiflavum</i>	L	28 j	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	R
<i>scrofulaceum</i>	L	28 j	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	S
<i>szulgai</i>	L	14 j	+	-	-	-	+	+	-	V	+	+	-	R
<i>xenopi</i>	L	28 j	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	R

E: eugonique; D: dysgonique; L: lisse; U: rugueuse; S: sensible; R: résistante; ND: non décrit ; V: variable.

Annexe 7 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe III de Runyon (Euzéby 2010)

	Aspect d'une colonie sur Löwenstein-Jensen	Croissance à 30°C	Croissance à 37°C	Croissance à 22°C	Croissance à 42°C	Croissance à 45°C	Nitrate réductase	Uréase	Arylsulfatase à 3 jours	Hydrolyse du tween en 3 j et 10 j	Phosphatase acide	Catalase à 22° et 68°C	Croissance à 5 % de NaCl	Thiosemicarbazone à 10 mg/l et Ethanbutol à 2 mg/l
<i>avium/intracellulare</i>	D, L	21 j	V	+	+	V	-	-	-	-/-	-	+/+	-	V/R
<i>celatum</i>	D, L	28 j	V	+	+	+	-	-	+	-/-	-	+/+	-	R/S
<i>gastri</i>	D, U, L	14 j	+	+	-	-	V	+	-	+/+	+	+/-	-	S/S
<i>haemophilum</i>	D, U, L	21 j	+	-	-	-	-	-	-	-/-	ND	+/-	-	ND
<i>malmoense</i>	D, L	21 j	+	+	-	-	-	V	-	-/+	-	+/V	-	R/R
<i>nonchromogenicum</i>	D, U, L	14 j	+	+	V	-	-	-	-	+/+	+	+/+	-	R/S
<i>shimoidei</i>	D, U	21 j	V	+	+	V	-	-	-	-/+	+	+/V	-	R/S
<i>terrae</i>	D, U, L	14 j	+	+	-	-	V	-	-	+/+	+	+/+	-	R/S
<i>triviale</i>	E, U	14 j	+	+	-	-	+	-	+	+/+	+	+/+	+	R/S
<i>ulcerans</i>	D, U	41 j	+	-	-	-	-	-	-	-/-	ND	+/-	-	ND
<i>xenopi</i>	D, L	28 j	-	+	+	+	-	-	+	-/-	-	+/+	-	R/R

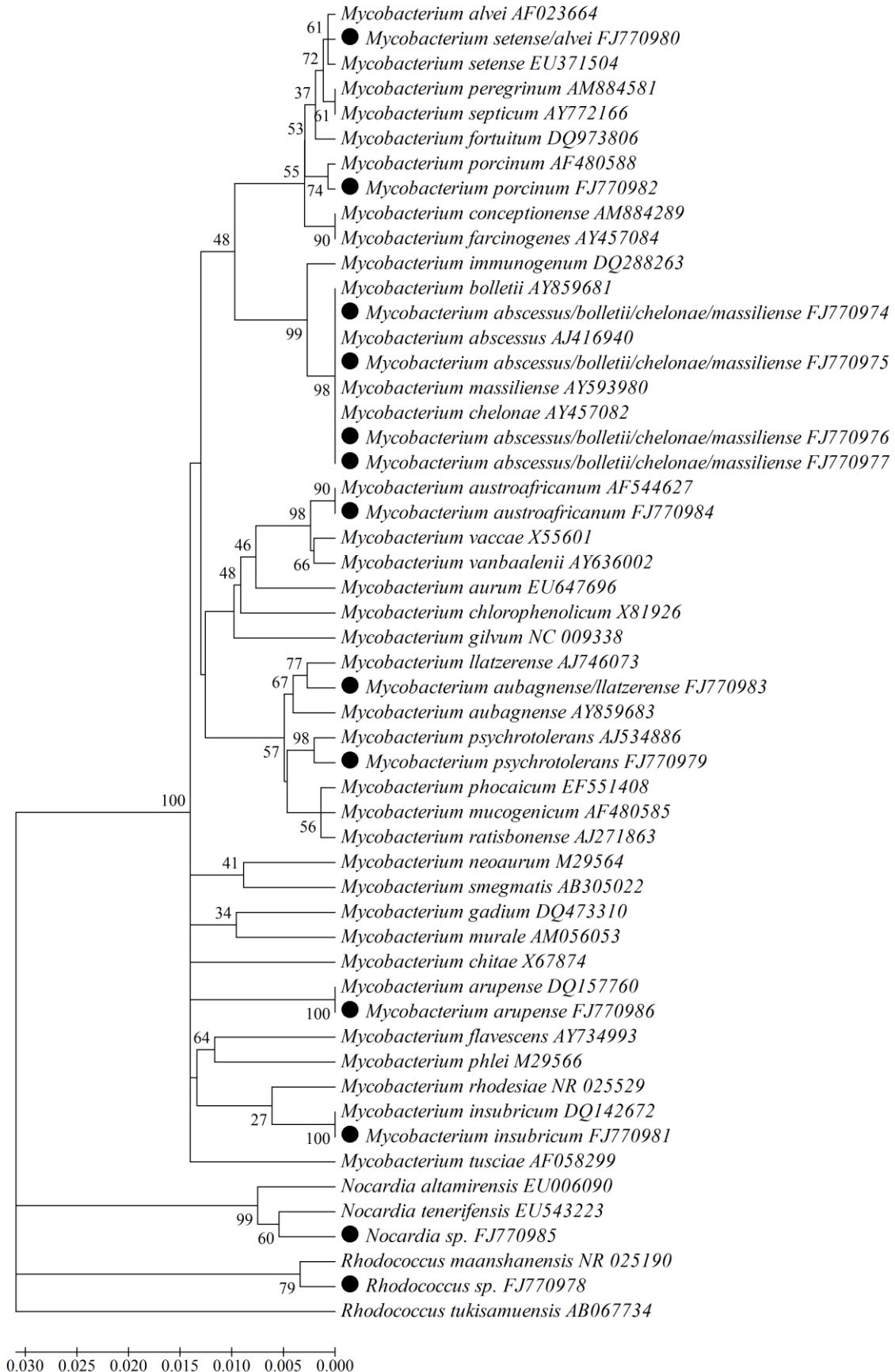
E: eugonique; D: dysgonique; L: lisse; U: rugueuse; S: sensible; R: résistante; ND: non décrit ; V: variable.

Annexe 8 : Caractères biochimiques d'identification des principales NTM d'intérêt médical du groupe IV de Runyon (Euzéby 2010)

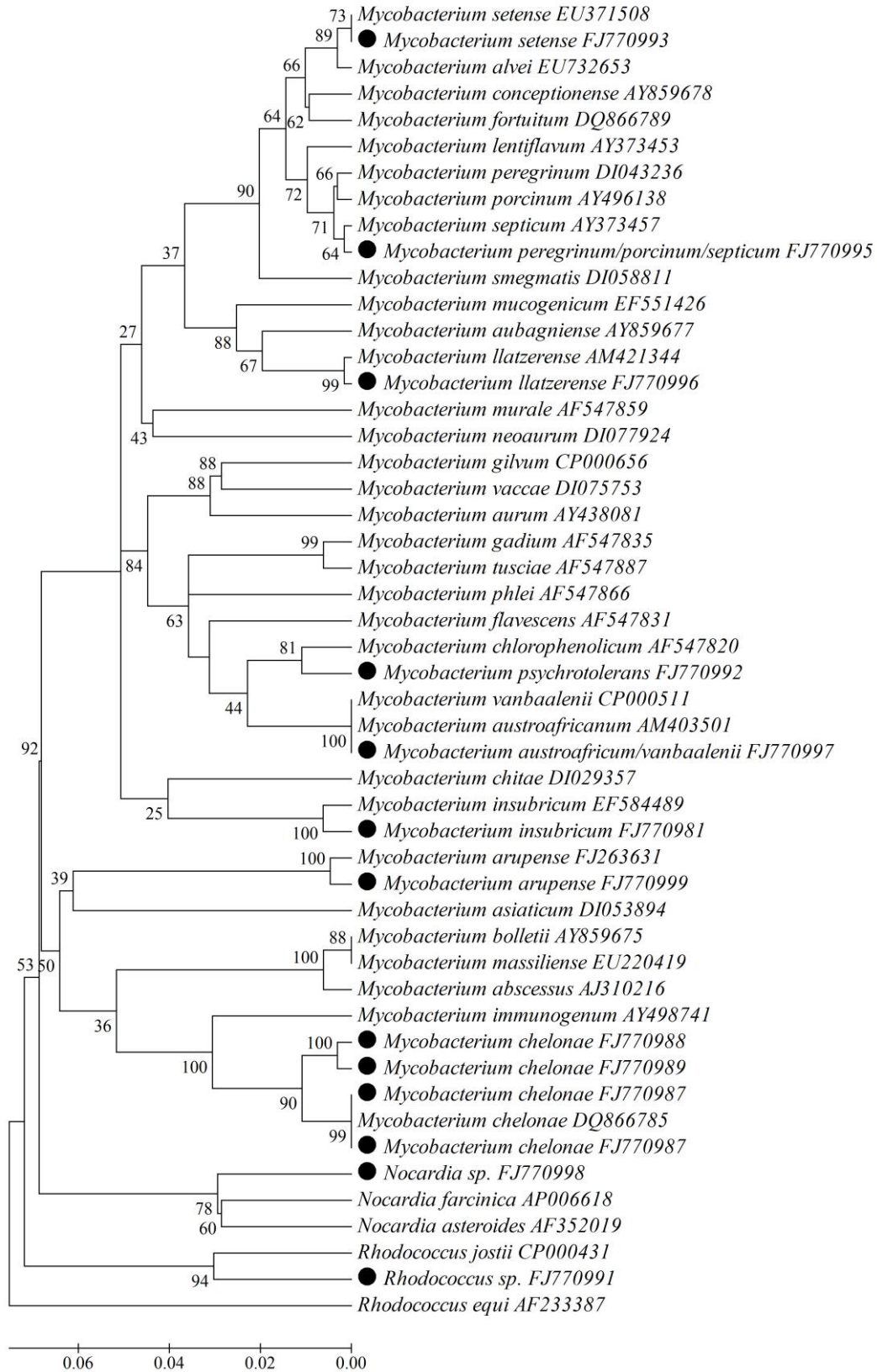
	Pigmentation	Croissance sur gélose Mac Conkey à 30°C	C croissance à 37°C	Croissance à 42°C	Croissance à 45°C	Croissance à 52°C	Nitrate réductase	Arylsulfatase à 3 jours	Croissance à 5 % de NaCl	Croissance sur citrate de sodium	Citrate de fer amoniacal	Utilisation lévulose	Utilisation mannitol	Utilisation inositol
<i>abscessus</i>	A	+	V	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>aurum</i>	S	-	V	-	-	-	V	V	V	+	+	+	+	+
<i>chelonae</i>	A	+	V	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>fortuitum</i>	A	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>immunogenum</i>	A	+	V	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>mucogenicum</i>	A	+	+	-	-	-	V	+	-	V	-	+	+	+
<i>peregrinum</i>	A	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>phlei</i>	S	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>senegalense</i>	A	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>smegmatis</i>	A/S	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>vaccae</i>	P	-	+	-	-	-	+	-	V	+	+	+	+	+

A: achromogène; S: scotochromogène; P: photochromogène; ND: non décrit ; V: variable.

Annexe 9 : Dendrogramme par distance Kimura's Two-parameter, embranchement Neighbourhood Joining, et 1000 répétition de calcul de séquences du gène *rrs* de bacilles acido-alcoolo-résistants isolés de la Seine (cercle noir) et de séquences de référence GenBank (numéro d'accès en face des microorganismes)



Annexe 10 : Dendrogramme par distance Kimura's Two-parameter, embranchement Neighborhood Joining, et 1000 réitération de calcul de séquences du gène *hsp65* de bacilles acido-alcoolo-résistants isolés de la Seine (cercle noir) et de séquences de référence GenBank (numéro d'accèsion en face des microorganismes)



Résumé

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

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

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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