HAL
open science

ETUDE ENVIRONNEMENTALE ET MOLECULAIRE DES MYCOBACTERIES ISOLEES AU CENTRE ET AU SUD DE LA COTE D'IVOIRE

Sabine N'Dri Vakou

To cite this version:

Sabine N'Dri Vakou. ETUDE ENVIRONNEMENTALE ET MOLECULAIRE DES MYCOBACTERIES ISOLEES AU CENTRE ET AU SUD DE LA COTE D'IVOIRE. Bactériologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire); N°ORDRE 2065/2017, 2017. Français. NNT : . tel-02417048

HAL Id: tel-02417048

https://theses.hal.science/tel-02417048v1

Submitted on 18 Dec 2019

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.

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique

Laboratoire de
Pharmacodynamie-Biochimique

Année Universitaire
2016-2017

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Spécialité : BIOLOGIE FONCTIONNELLE ET MOLECULAIRE

Numéro d'ordre
2065 /2017

Mlle VAKOU N`DRI SABINE

ETUDE ENVIRONNEMENTALE ET MOLECULAIRE DES MYCOBACTERIES ISOLEES AU CENTRE ET AU SUD DE LA COTE D'IVOIRE

Soutenue publiquement
Le, 07 / 11 / 2017

Commission du jury

M. KOUA Hervé	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
Mme DOSSO Mireille	Professeur Titulaire	UFHB	Co-Directeur
M. N'GUESSAN K. Raymond	Maitre de Recherches	IPCI	Rapporteur
M. OUASSA Timothée	Maitre de Conférences Agrégé	UFHB	Examinateur

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

Au Seigneur Dieu Tout Puissant, Créateur de toutes choses,

Dédicaces

A mon père, Vakou Sigui André, Toi qui m'as donné l'envie de me battre, tu as toujours cru en mes capacités, puisses tu recevoir ce travail en guise d'excuses et de soulagement.

A mes mamans, puisse Dieu vous accorder une santé de fer afin de pouvoir bénéficier encore de jours heureux ensemble.

A mon mari, Blele Armand, pour avoir été présent dans les bons comme dans les mauvais jours, puisse Dieu nous accorder encore la Grace d'être ensemble pour l'éternité.

A mon fils, Blele Melchisédech Ange Michael que te dire de plus sinon de réussir partout dans ta vie même là où ta mère a échoué. Bon arrivée dans le monde des vivants.

A Jennyfer M'baye, que te dire de plus sinon de demeurer telle que tu es, change rien surtout.

A toute ma famille, mes amis et connaissances

A vous tous, j'espère pouvoir vous donner un peu de ce que j'ai reçu de vous.

DIEU vous guide.

REMERCIEMENTS

Madame DOSSO Mireille, Professeur titulaire, Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Co-directeur de cette thèse pour sa clairvoyance, ses conseils, sa patience et surtout son obstination constructive sans laquelle nous n'aurions pas réalisé ce travail. Puisse DIEU vous bénir d'avantage, et vous donner la force de continuer notre formation.

Monsieur DJAMAN Allico Joseph, Professeur titulaire, Chef de département de Biochimie Clinique et fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Directeur de Laboratoire à l'Université Félix Houphouët-Boigny. Directeur de ce mémoire, Votre esprit d'ouverture et votre passion pour le travail bien fait nous a permis de continuer et de terminer ce travail. Soyez en remercier, DIEU vous garde.

Monsieur KOUA Hervé, Professeur titulaire, votre réputation vous a précédé. Votre rigueur a beaucoup apporté à l'amélioration de ce travail en tant que Président du Jury. Merci de nous avoir permis de bénéficier de votre grande culture scientifique et de votre enthousiasme pour la recherche.

Monsieur OUASSA Timothée, Maitre de Conférences agrégé, nous remercions sincèrement d'avoir contribué à l'amélioration de ce travail en tant que Examinateur. Nous vous exprimons toute notre profonde gratitude.

Monsieur N'GUESSAN Raymond, Maitre de Recherche, votre action pour la construction de ce mémoire a été au-delà de votre rôle de rapporteur. Vous avez conseillé, encouragé et guidé quand il le fallait. Veuillez accepter de recevoir l'expression de notre profonde gratitude pour toute l'attention portée à mes travaux et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Merci pour votre aide.

Nos remerciements vont à l'endroit de **Madame Kakou Solange,** Maitre de recherche en Microbiologie, **Monsieur AOUSSI Serge**, Chargé de recherche en Cytologie**, Monsieur Aka N'guetta,** Attaché de recherche en Bactériologie**, Monsieur Coulibaly Kalpy,** Chargé de recherche en Microbiologie, **Monsieur Coulibaly David,** Chargé de recherche en Microbiologie, **Monsieur Koffi Stéphane,** Maitre assistant en Bactériologie, **Monsieur Kouassi Kan Stéphane,** Attaché de recherche en Microbiologie, **Monsieur Adon,** Chargé de recherche en Biologie cellulaire, **tout le personnel de la plate forme de Biologie moléculaire,** votre contribution à la réalisation de ce travail ainsi que celle de vos équipes respectives ne saurait être évalué. Nous voudrons vous exprimer par ces mots notre infinie gratitude.

Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Bactériologie.
Un merci particulier à tous mes collaborateurs de l'Unité de Chimie et Microbiologie Environnementale : **Amon Lydie, Ehuie Pierre, Yeo Kadjowely, Bamba Aboubacar, Gueu Romoé, Assindi Marcel, Ouattara Aminata, Mr Odilon Achiepo**. Merci pour votre disponibilité sans limites, votre aide et votre soutien. DIEU vous bénisse.

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Sous la direction scientifique de **Monsieur DJAMAN Allico Joseph,** Professeur titulaire, Chef de département de Biochimie Clinique et fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Directeur du dit Laboratoire à l'Université Félix Houphouët-Boigny et sous l'encadrement technique de **Madame DOSSO Mireille**, Professeur titulaire, Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Nous avons également bénéficié de la collaboration des Laboratoires de Mycobactéries environnementales de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire site d'Adiopodoumé, de la plateforme de Biologie moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire site d'Adiopodoumé, de l'Unité de Chimie et Microbiologie Environnementale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire site d'Adiopodoumé.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la caractérisation des Mycobactéries environnementales ulcératives probables dans des zones endémiques d'Ulcère de Buruli en Côte d`Ivoire.

La problématique des Mycobactéries environnementales ulcératives probables se situe aujourd'hui partout dans le monde. Il existe très peu d'informations sur les Mycobactéries responsables d'ulcérations à part *M. ulcerans*, responsable de l'Ulcère de Buruli. Leur mode de transmission dans l'environnement est mal connu. Face aux insuffisances relévées, nos travaux visent à faire une investigation de différents sites écologiques dans des régions ou sévit l'Ulcère de Buruli à la recherche de Mycobactéries non Tuberculeuses autres que *M. ulcerans* avec des outils et techniques couramment utilisées en Mycobactériologie clinique. Ils permettront ainsi de faire un état de lieu quant à la biodiversité génétique des souches de Mycobactéries circulant en Côte d'Ivoire.

Une telle approche permettra surement d'avoir des informations sur un meilleur diagnostic des ulcérations cutanées chroniques attribuées à tord ou à raison à *Mycobacterium ulcerans*, responsable de l'Ulcère de Buruli qui est un véritable problème de santé publique dans les pays en voie de développement.

TABLE DES MATIÈRES

DEDICACES ET REMERCIEMENTS i
AVANT-PROPOS v
LISTE DES FIGURES viii
LISTE DES TABLEAUX ix
LISTE DES ABREVIATIONS x
INTRODUCTION 1
I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 6
I-1 MYCOBACTERIE 7
I-1-1 Historique 7
I-1-2 Classification des Mycobactéries 8
I-1-3 Espèces de Mycobactéries 10
I-1-4 Caractères morphologiques et structuraux d`une Mycobactérie 11
I-1-5 Croissance des Mycobactéries 15
I-1-6 Milieux de culture des Mycobactéries 16
I-1-7 Méthode de culture des Mycobactéries 18
I-1-8 Identification d`une Mycobactérie 19
I-1-9 Caractéristiques génétiques des Mycobactéries 24
I-1-10 Les Mycobactéries à travers le monde 29
I-1-11 Infections à Mycobactéries 30
I-2 FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX 36
I-2-1 Facteurs climatiques 36
I-2-2 Habitats aquatiques et terrestres 36
I-2-3 Filières de potabilisation 39
I-2-4 Réseaux de distribution d'eau potable 39
I-2-5 Interactions 40
I-3 OUTILS ANALYTIQUES APPLICABLES AUX ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX 47
I-3-1 Détection et Quantification des Mycobactéries par microscopie 47
I-3-2 Détection et Quantification des Mycobactéries par culture 49
I-3-3 Détection et Quantification des Mycobactéries par chromatographie 51
I-3-4 Détection et Quantification des Mycobactéries par outils moléculaires 52
II. MATERIEL ET METHODES 64
II-1 MATÉRIEL 65

II-1-1 Zones d'étude 65
II-1-2 Choix des stations d'échantillonnage 65
II-1-3 Type d'étude 73
II-1-4 Cadre de l'étude 73
II-1-5 Matériel d'échantillonnage 73
II-1-6 Matériel d'analyse 75
II-2 Méthodes 82
II-2-1 Méthode d'échantillonnage 82
II-2-2 Paramètres Physico-chimique 83
II-2-3 Mise en culture des échantillons d`eaux et de sédiments 88
II-2-4 Analyses moléculaires 93
II-2-5 Analyse statistique 99
III- RESULTATS ET DISCUSSION 100
III-1 Résultats 101
III-1-1 Répartition des échantillons en fonction des sites d'étude 101
III-1-2 Identification microbiologique des Mycobactéries environnementales 103
III-1-3 Identification moléculaire des Mycobactéries environnementales 111
III-1-4 Paramètres physico-chimiques des sites 118
III-2 DISCUSSION 128
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 136
REFERENCES 139
ANNEXES 176
PUBLICATIONS 188

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne	**13**
Figure 2	Relation phylogénétique entre les séquences du gène *hsp*65 chez les Mycobactéries	**27**
Figure 3	Organisation génétique des gènes impliqués dans la synthèse des mycolactones A et B, principalement des polykétides synthétases de type I	**35**
Figure 4	Réseau lagunaire dans la région d'Abidjan	**68**
Figure 5	Marre de SOKROGBO (TIASSALE)	**70**
Figure 6	Site de LOKA (BOUAKÉ)	**71**
Figure 7	Sites d`étude	**72**
Figure 8	Matériel d'échantillonnage: (A= benne à sédiment EKMAN; B=Bouteille hydrologique)	**74**
Figure 9	Souches de Mycobactéries à croissance rapide sur Gélose ordinaire	**108**
Figure 10	Détection de la ketoréductase des souches par PCR en temps réel	**113**
Figure 11	Electrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant 0.5 µg/ml de BET des produits d'amplification par MIRU 1 à partir de souches bactériennes.	**116**
Figure 12	Electrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant 0,5 µg/ml de BET des produits d'amplification par ST 1 à partir de souches bactériennes.	**117**
Figure 13	Corrélations entre les différents paramètres physico-chimiques	**124**
Figure 14	Paramètres Physico-Chimiques influençant la présence et l`absence des Mycobactéries	**126**
Figure 15	Représentation du site le plus propice à la prolifération des Mycobactéries	**127**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Amorces utilisées pour l'amplification des gènes	**81**
Tableau II	Programme d'amplification des gènes	**82**
Tableau III	Profils VNTR de *M. ulcerans* et d'autres MPM basé sur le nombre de répétitions au niveau des différents loci (MIRU1, locus6, ST1, et Locus 19)	**98**
Tableau IV	Nombre d'échantillons par site de prélèvement	**103**
Tableau V	Caractères microscopiques des colonies	**105**
Tableau VI	Pigmentation des colonies	**107**
Tableau VII	Nombre de souches isolées par site en fonction du type d`échantillon	**110**
Tableau VIII	Espèces de Mycobactéries identifiées par site	**111**
Tableau IX	Caractéristiques moléculaires des espèces de Mycobactéries identifiées par sites	**114**
Tableau X	Typage moléculaire des espèces de Mycobactéries identifiées par sites	**118**
Tableau XI	Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques des eaux	**121**
Tableau XII	Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques des sédiments	**122**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AFB: Acid-Fast Bacilli

AM: Acide mycolique

ARNr (rRNA) : Acide Ribonucléique ribosomal

BAAR: Bacille Acido-Alcoolo Resistant

BCG: Bacille de Calmette et Guerin

BET : Bromure d'Ethidium

UB : Ulcere de Buruli

°C : Degré Celsius

CM: Common Mycobacteria

CNM : *Corynebacterium- Norcadia-Mycobacterium*

EDTA: Éthylène Diamine Tétra Acétique

FGM : Fast Growing Mycobacteria

FSH: Fluorescent Sandwich Hybridization

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques

LAM: lipoarabinomannane

LJ : Loweinsten- Jensen

MAA: *Mycobacterium avium ssp. Avium*

MAC : *Mycobacterium avium-intracellulare* complex

MAG: mycoarabinogalactane

MAH: *Mycobacterium avium ssp. hominissuis*

MAIS: *Mycobacterium avium intracellulare-scrofufulaceum* complex

MALDI-TOF: Matric Assisted Laser Desorption Ionisation- Time of flight

MAP: *Mycobacterium avium paratuberculosis*

MAS: *Mycobacterium avium ssp. silvaticum*

MET : Microscope électronique à Transmission

MFC: *Mycobacterium fortuitum* Complex

MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuses

MOTT : Mycobacterium Other Than Tuberculosis

MPC: *Mycobacterium parafortuitum* Complex

MPM : Mycobactéries Productrices de Mycolactone

mS/cm : Millisiemens /Centimètre

MTC : *Mycobacterium tuberculosis Complex*

MtC: *Mycobacterium Terrae* Complex

OADC: Acide Oleique Albumine bovine Dextrose Catalase

OMS : Organisation Mondial de la Santé

PANTA: Polymyxine B ; Amphotéricine B ; Acide nalidixique ; Trimethoprime ; Azlociline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PPEM : Potentially pathogenic environmental mycobacteria

SGM: Slow- growing mycobacteria

UTN(NTU) : Unité Turbidité Néphélométrique

ZN: Ziehl-Neelsen

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Au début du XXe siècle, les Mycobactéries responsables de la tuberculose et de la lèpre, espèces strictement pathogènes pour l`homme et les animaux, étaient au premier rang des préoccupations de santé publique. Les autres Mycobactéries étaient reléguées au rang de saprophytes et leur pouvoir pathogène était largement méconnu. Ce n'est qu'après la seconde moitié du XXe siècle que de plus en plus de cas de mycobactérioses ont été rapportés grâce aux progrès de l'identification microbiologique, à une meilleure connaissance du pouvoir pathogène de ces Mycobactéries et en raison du nombre croissant de patients immunodéprimés atteints d`infections opportunistes (**Wolinsky *et al.*, 1979 ; Griffith *et al.*, 2007**). Depuis lors, de nombreuses espèces de Mycobactéries ont été retrouvées à des concentrations variables dans l'environnement. Plusieurs ont été identifiées comme étant responsables de mycobactérioses et seraient présentes dans l`eau, le sol, les sédiments, les biofilms etc… (**Wolinsky, 1979; Marras & Daley, 2002**). Les Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT) ou Mycobactéries Atypiques sont des germes de l'environnement habituellement non pathogènes. Les connaissances actuelles sur l'origine exacte de ces infections restent très limitées. Elles ont la capacité d'envahir un hôte et causer des infections opportunistes, simulant ou non la tuberculose (**Griffith *et al.*, 2007**). Ces infections peuvent êtres pulmonaires, cutanées ou lymphatiques chez le sujet immunocompétent ou des infections disséminées chez le sujet immunodéprimé **(Dailloux *et al.*, 1999)**. Ces infections ne sont pas liées à une transmission interhumaine, les cas épidémiques étant liés à une contamination à partir d'un réservoir commun, exclusivement environnemental, qui est le plus souvent l'eau. Parmi les nombreuses infections dont sont responsables ces Mycobactéries, les infections cutanées ou pulmonaires sont les plus répandues **(Kiehn *et al.*, 1985; Damsker & Bottone, 1985 ; Wansbrough-Jones & Phillips, 2006 ; Randomski *et al.*, 2010)**. Elles ont un impact significatif sur la mortalité chez l'homme et un impact économique important au niveau de l'agriculture (**Falkinham, 2002)**. Ces infections causées par ces Mycobactéries présentent des difficultés diagnostiques et surtout thérapeutiques malgré un traitement antibiotique adapté. La présence de ces Mycobactéries dans l'environnement est souvent influencée par certaines conditions environnementales propices à leur croissance (**Iivanainen *et al.*, 1993 ; Falkinham *et al.*, 2004 ; Niva *et al.*, 2006**). Le nombre et l'importance des infections causées par ces espèces de Mycobactéries ne cessent d'augmenter dans plusieurs parties du globe. (**Bloom & Murray, 1992 ; Thomson, 2010**).

Si certains groupes à risques sont bien identifiés, le diagnostic reste complexe et les indications thérapeutiques difficiles à poser. Plusieurs questions restent ouvertes et font l'objet de nombreux travaux dans le monde. Les travaux actuels portent sur trois axes.

Le premier est relatif à l'étude de l'écosystème des Mycobactéries Non Tuberculeuses. A ce jour, les niches écologiques des Mycobactéries Non Tuberculeuses sont très peu exploitées. Le second axe concerne la physiopathologie et les mécanismes de transmission des souches de Mycobactéries Non Tuberculeuses. Le troisième domaine a trait à la mise au point de traitements médicamenteux et de vaccins grâce à l'identification de la structure de la mycolactone, toxine sécrétée par *M. ulcerans* et d'autres Mycobactéries productrices de mycolactone de l'environnement.

En Côte d'Ivoire, la mycobactériose la plus répandue après la tuberculose, et avant la lèpre, est l'Ulcère de Buruli (**Olivia, 2004 ; Wansbrough-Jones & Phillips, 2006**). C'est une infection très invalidante causée par *Mycobacterium ulcerans,* qui est une Mycobactérie de l`environnement. En Afrique de l'Ouest, la Côte d'Ivoire est le pays le plus touché avec environ 2000 cas notifiés par an selon l'OMS. Elle représente donc un véritable problème de santé publique. A ce jour, selon le programme national de l'Ulcère de Buruli, les étiologies des ulcérations cutanées chroniques en Côte d'Ivoire sont dominées par *Mycobacterium ulcerans*. En outre, la littérature montre qu'il existe des Mycobactéries incriminées dans ces ulcérations cutanées chroniques (**Horsburgh, 1996 ; Lehtinen *et al.,* 2005 ; Griffith *et al.,* 2007)**. Il existe très peu d'informations sur les Mycobactéries responsables d'ulcérations à part *M. ulcerans,* responsable de l'Ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Leur mode de transmission dans l'environnement est mal connu, et requiert des outils analytiques qui sont peu ou insuffisamment adaptés aux échantillons prélevés dans l'environnement. Face aux insuffisances relévées, les questions suivantes seront abordées dans le cadre de cette thèse :

Question 1 : Selon la littérature, les espèces de Mycobactéries environnementales isolées sont en nombre croissant dans les pays industrialisés. La distribution des espèces couramment isolées est en changement constant dans la plupart de ces pays et de nouvelles espèces sont identifiées grâce aux différentes techniques moléculaires (**Martin-Casabona et *al.,* 2004**). Dans un pays à forte endémicité d'Ulcère de Buruli, telle que la Côte d'Ivoire, la présence d'espèces de Mycobactéries autres que *M. ulcerans,* potentiellement pathogènes est sous estimée alors que ces espèces sont capables d'entraîner de lourdes conséquences socio-économiques et sanitaires.

Quelles sont les espèces de Mycobactéries rencontrées dans l'eau et les sédiments en Côte d'Ivoire?

Hypothèse 1 : Il existerait une forte diversité mycobactérienne au niveau de l'eau et les sédiments en Côte d'Ivoire.

Question 2 : Les Mycobactéries sont capables de se développer dans des conditions extrêmes comme les écosystèmes acides ou les eaux alcalines (**Kirschner *et al.*, 1992** ; **Falkinham et *al.*, 2004**). Elles colonisent l'eau qui est en général polluée par différents agents (produits chimiques, déchets ménagers…). Elles se multiplient préférentiellement dans des milieux présentant des conditions particulières (**Iivanainen et *al.*, 1993 ; Leys et *al.*, 2005** ; **Randomski, 2012**). Certains paramètres physico-chimiques agissant isolément ou en synergie seraient ainsi incriminés dans la présence des Mycobactéries (**Bland et *al.*, 2005**). Quelles sont les paramètres physico-chimiques susceptibles de favoriser la prolifération des Mycobactéries au niveau des zones de prélevements identifiées (Sud et Centre de la Côte d'Ivoire)?

Hypothèse 2 : Certains paramètres physico-chimiques seraient propices à la prolifération des Mycobactéries.

Question 3 : Certaines souches mycobactériennes apparentées à *M. ulcerans* seraient productrices de mycolactone, une toxine responsable d'ulcération (**Pirjo torkko *et al.*, 2001 ; Pidot *et al.*, 2010**). Les Mycobactéries productrices de mycolactone (MPM) autres que *M. ulcerans* peuvent entraîner des ulcères cutanées chez l'homme et seraient retrouvées dans l'environnement (**Kiehn *et al.*, 1985 ; Damsker & Bottone, 1985 ; Wansbrough-Jones & Phillips, 2006 ; Randomski *et al.*, 2010)**. Dans un pays à forte endémicité, telle que la Côte d'Ivoire, toutes les espèces de Mycobactéries environnementales possèdent-elles des gènes retrouvés chez *M. ulcerans*?

Hypothèse 3 : Les Mycobactéries environnementales isolées possèderaient des gènes retrouvés chez *M. ulcerans*.

Pour répondre à ces questions, le but de cette étude est de caractériser des Mycobactéries environnementales ulcératives probables dans des zones endémiques d'Ulcère de Buruli en Côte d`Ivoire.

De façon spécifique, il s'agissait de :

- Identifier les Mycobactéries environnementales au niveau des zones cibles ;

- Déterminer les paramètres physico-chimiques de ces zones susceptibles d`influencer la présence des Mycobactéries ;
- Analyser les caractéristiques moléculaires des souches de Mycobactéries isolées dans l'environnement.

L'intérêt de cette étude est de faire une investigation de différents sites écologiques dans des régions ou sévit l'Ulcère de Buruli à la recherche de Mycobactéries non Tuberculeuses autres que *M. ulcerans* avec des outils et techniques couramment utilisées en Mycobactériologie clinique. Le manuscrit qui découle de ce travail de recherche se présente de la façon suivante :

- La première partie est consacrée à la recherche bibliographique sur les Mycobactéries environnementales en particulier les Mycobactéries atypiques et les facteurs physico-chimiques liés à leur croissance.
- La deuxième partie est focalisée d'une part sur les techniques microbiologiques utilisées pour isoler et caractériser les espèces de Mycobactéries rencontrées au niveau de chaque site d'étude, d'autre part sur les techniques photométrique et colorimétrique utilisées pour identifier les paramètres physico-chimiques susceptibles d'influencer la présence des Mycobactéries.

I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1 MYCOBACTERIE

I-1-1 Historique

Au début du XIXe siècle, Laennec individualise la tuberculose. En 1865, Villemin montre qu'il s'agit d'une maladie inoculable à l'animal et transmissible d'un animal à l'autre. Le bacille responsable de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, est isolé en 1882 par Robert Koch, qui démontre pour la première fois qu'une bactérie est responsable d'une pathologie définie. De plus, il réussit à colorer celui-ci dans les lésions tuberculeuses et à le cultiver en 1884 sur milieu de sérums coagulés. Quelques années plus tard, en 1887, Roux et Nocard montrent que la croissance du bacille tuberculeux est stimulée quand la glycérine est ajoutée dans le milieu. En 1873, Armauer Hansen découvre l'agent étiologique de la lèpre sans pour autant l'isoler sur un milieu de culture. Les travaux de Smith de 1896 à 1898 aboutissent à la découverte en 1902 du bacille tuberculeux bovin (*Mycobacterium bovis*) qui est différent du bacille de la tuberculose humaine. Au cours de la même période, *Mycobacterium paratuberculosis*, synonyme de *Mycobacterium johnei* (agent de l'entérite hypertrophiante des bovidés), est également décrit (**Johne & Frothingham, 1895**). Cependant, jusqu'en 1950, les seules espèces considérées comme pathogènes chez l'homme sont *M. leprae* et *M. tuberculosis*. En 1920, fut découvert pour la première fois, par Calmette, les Mycobactéries différentes de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Mycobacterium bovis.* En 1954, Timpe et Runyon découvrent également que ces Mycobactéries atypiques ont un pouvoir pathogène. Ziehl et Neelsen améliorent la technique de coloration mise au point par Paul Ehrlich, qui mettait en évidence l'acido-alcoolo résistance de ces bactéries. En 1959, fut réalisée pour la première fois, la classification des Mycobactéries par la méthode de Runyon basée sur la pigmentation des colonies et la vitesse de croissance des Mycobactéries. Par la suite, les travaux sur les Mycobactéries se multiplient, A. Calmette et C. Guerin mettent au point en 1921 le vaccin contre la tuberculose qui portera leur nom, le bacille de Calmette et Guérin ou BCG. Castets, Boisvert, Grumbach, Brunel et Rist en 1968 décrivent une variété des bacilles tuberculeux isolés chez les Africains. Cette espèce prend le nom *Mycobacterium africanum*. Le terme « Mycobactéries atypiques » est appliqué en 1935 par Pinner pour caractériser des Mycobactéries autres que les bacilles de la tuberculose et de la lèpre pouvant provoquer des pathologies chez l'homme ou chez l'animal. De nombreux autres termes sont également utilisés : « Mycobactéries Non Tuberculeuses », « Mycobactéries opportunistes » et « Mycobactéries de l'environnement ».

Par la suite, des Mycobactéries atypiques responsables d'infections chez l'homme sont caractérisées : *M. ulcerans* en 1948 (**Mac Callum *et al.*, 1948**), *M. marinum* en 1951 (**Linell *et al.*, 1954**). En 1953, de nouvelles infections à Mycobactéries sont décrites : *M. abscessus* (**Moore *et al.*, 1953**), *M. kansasii* (**Buhler *et al.*, 1953**), *M. avium-intracellulare* (**Karlson *et al.*, 1953**). Les mycobactérioses dues aux Mycobactéries atypiques sont difficiles à estimer car ces maladies ne sont pas à déclaration obligatoire. Contrairement à la tuberculose et à la lèpre pour lesquelles il existe des traitements spécifiques bien établis, les mycobactérioses restent des pathologies difficiles à traiter du fait de la résistance des Mycobactéries atypiques à la plupart des antibiotiques antituberculeux.

I-1-2 Classification des Mycobactéries

D'après le Bergey's manuel, les Mycobactéries appartiennent au Règne des Bacteria, au Phyllum des Actinobacteria, à l'Ordre des Actinomycètales, au Sous-Ordre des Corynebacterinae, à la famille des Mycobacteriacea et au genre *Mycobacterium* (**Murray *et al.*, 1989** ; **Shinnick & Good, 1994 ; Nolte & Metchock, 1995**). 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**). Au sein du genre *Mycobacterium*, trois grands ensembles d'espèces sont décrits :

- 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*
- Mycobactéries responsables de la lèpre humaine et féline, respectivement *M. leprae* (aussi nommée Hansen et anciennement *Bacterium leprae*) et *M. lepraemurium*
- Mycobactéries non tuberculeuses (MNT), 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 **(Radomski *et al.*, 2010)**.

Au sein des MNT, des ensembles d'espèces ou de sous-espèces sont également 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 & 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. bouchedurhonense*, *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 qui sont 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), un second complexe de MNT 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 & 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 & 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**).

Certaines sont opportunistes et peuvent être responsables d'abcès, de lésions cutanées, ostéo-articulaires, pulmonaires ou d'infections disséminées : *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*.

En fonction de leur pouvoir pathogène, les Mycobactéries peuvent être regroupées en plusieurs groupes :

- Mycobactéries pathogènes obligatoires en y intégrant les espèces du MTC et *M. leprae*
- Mycobactéries potentiellement pathogènes en y intégrant les MNT *M. ulcerans, M. marinum, M. abscessus, M. fortuitum, M. chelonae, M. kansasii, M. avium, M. intracellulare, M. malmoense, M. xenopi et M. haemophilum*
- Mycobactéries saprophytes environnementales qui intégrerait l'ensemble des autres espèces de MNT (**Kazda, 2009 ; Kazda & Pavlik, 2009 ; Pavlik *et al.*, 2002)**.

D'autres auteurs parlent de :

- 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.
- 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 & Jenkins, 1998a ; Kazda, 2000**).

Il n'y a donc pas de consensus sur la pathogénicité des MNT. Effectivement, certaines MNT peuvent coloniser les surfaces cutanées, les muqueuses ou les sécrétions biologiques sans provoquer de maladie (**Hopewell & Bloom, 2000**), mais rares sont les espèces de MNT qui n'ont jamais été décrites dans des cas infectieux humains ou animaux (**Tortoli, 2006**).

I-1-3 Espèces de Mycobactéries

Le nombre des espèces de Mycobactéries a considérablement augmenté de 40 en 1980 à 110 en 2004 (**Skerman *et al.*, 1980**). A la fin de 1983, 52 espèces seulement étaient décrites. Seulement 6 nouvelles espèces étaient ajoutées entre 1984 et 1991 et 4 nouvelles espèces par an entre 1992 et 2003. En 2004, 12 nouvelles espèces étaient décrites ou étaient en cours de validation (**Skerman *et al.*, (1980**). A l'exception de l'espèce de *M. pulveris* (**Tsukamura *et al.*, 1983a**) qui est considérée comme une MNT à croissance intermédiaire, la dernière estimation du nombre d'espèce et de sous-espèces appartenant au genre *Mycobacterium* recense 78 MNT à croissance rapide et 79 MNT à croissance lente.

Ce recensement des espèces ou sous-espèces du genre *Mycobacterium* arrive à une estimation de 157 MNT, dont seulement 41 espèces ou sous espèces, ont été officialisées dans la dernière liste des noms bactériens acceptés (**Skerman *et al.*, 1989**).

I-1-4 Caractères morphologiques et structuraux d`une Mycobactérie

Etymologiquement, le genre *Mycobacterium*, du grec *myces*, qui signifie un champignon, *backterion*, qui signifie une baguette (en bactériologie, un petit bacille) constitue un groupe de bactéries ressemblant à des champignons. La ressemblance se situe seulement au niveau de leur capacité à se développer en s'étalant à la surface des milieux liquides. Les Mycobactéries sont pléomorphes, Gram positif, non mobiles, 0.2 à 0.6 µm de diamètre et 1 à 10 µm de long. Elles sont de petits bacilles aérobies assez longs et fins, asporulés et acapsulés, non ramifiés et producteurs de catalase (**Denis, 2007**). 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 de ces espèces. Contrairement aux bactéries à Gram positif classiques, la paroi des Mycobactéries, présente 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**).

La 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**). Ces deux polyosides pariétaux joueraient un rôle majeur dans la virulence des Mycobactéries, et dans la résistance naturelle 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. 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. Le LAM jouerait un rôle dans la cohésion de la paroi (**Euzéby, 2010**). Les acides mycoliques sont des acides 3-hydroxy carboxyliques avec une chaine 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 & Jenkins, 1998a ; Goodfellow &**

Magee, 1998), alors que les acides mycoliques de 22 à 72 atomes de carbone, avec au maximum 5 insaturations, sont rencontrés chez les *Actinobacteria* apparentées au genre *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonae*, *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella* (**Gangadharam & Jenkins, 1998a**). Concernant le genre *Mycobacterium*, la 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 chimiques (**Minnikin, 1982**) : Ce sont des Bacilles Acido-Alcoolo Résistants (BAAR) (**Murray, 1995**).

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 sulpholipides, les phénolglycolipides et les dimycolates de tréhalose, ainsi que de protéines comme les porines, et de peptidoglycolipides nommés mycosides (**Euzéby, 2010**) (**Figure 1**).

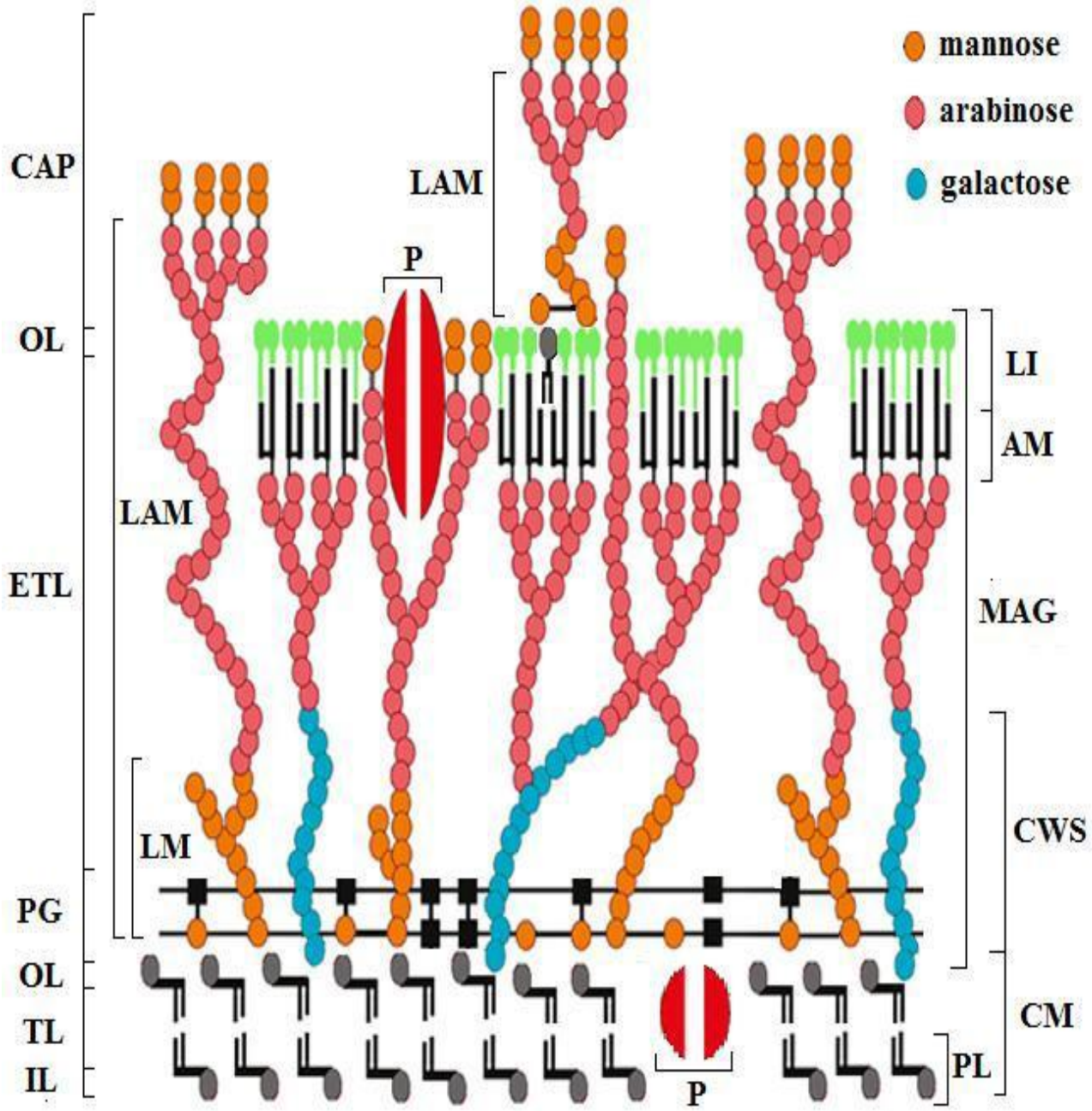


Figure 1 : **Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne (Legrand *et al.*, 1999)**

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.

Les cellules des genres *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 % (**Gangadharam & Jenkins, 1998a ; Prescott *et al.*, 2003 ; Euzéby, 2010**), ainsi qu'un niveau important d'acide mycolique (**Gangadharam & 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-alcoolo-résistants comme les Mycobactéries (acid-fast bacilli : AFB). Néanmoins, cette acido-alcoolo-résistance reste facultative pour ces espèces, contrairement aux Mycobactéries.

La propriété de bacille acido-alcoolo résistant (BAAR) des Mycobactéries leur permet d'être 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 & Falkinham, 1989 ; Falkinham *et al.*, 2004**). Les Mycobactéries ont un métabolisme hétérotrophe intermédiaire aux bactéries prototrophes et auxotrophes (**Ramakrishnan *et al.*, 1972**). Elles 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 chaine 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 chaines d'acides gras linéaires 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 chaines, le deuxième pour les ramifications méthylées multiples du côté carboxyle des chaines, et le troisième pour la ramification des acides gras présentant de longues chaines et une ou deux fonctions oxygénées. 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**).

I-1-5 Croissance des Mycobactéries

Sans parler du MTC dont les espèces ont toute une croissance lente, ni du complexe lépreux dont les espèces ne sont pas cultivables *in vitro* (*M. leprae*) ou très difficilement (*M. lepraemurium*), les MNT sont divisées en deux grands ensembles :

Les MNT à croissance rapide (*fast-growing mycobacteria: FGM*) et les MNT à croissance lente (*slow-growing mycobacteria: SGM*).

- Les MNT à croissance rapide seraient visibles à l'œil nu avant 8 jours à 37°C sur le milieu Löwenstein-Jensen, et aptes à se développer sur gélose trypticase soja (**Wallace *et al.*, 1998**) comprenant: *Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae et Mycobacterium fortuitum*.
- les MNT à croissance lente le seraient après 7 jours dans les mêmes conditions (**Euzéby, 2010**). Elles sont incapables de cultiver sur des milieux standards. Elles sont associées aux infections cutanées comprenant les Mycobactéries de la lèpre et les Mycobactéries Atypiques tels que : *M. avium, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium marinum, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium xenopi et Mycobacterium malmoense* (particulièrement en Europe).

Néanmoins, cette segmentation repose en réalité sur plusieurs critères tels que la croissance, dans certaines conditions de substrats et de température, la pigmentation, ainsi que la résistance et la tolérance à certains composés.

Les MNT 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 MNT 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 existe peu de donnée sur le temps de génération des MNT dans l'environnement. Néanmoins dans des conditions optimales en laboratoire, les temps de génération vont de 2 heures pour la MNT à croissance rapide *M. smegmatis*, à 21 heures pour la MNT 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* (**Williams *et al.*, 1998**).

Des exceptions sont aussi à noter comme les MNT 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 (**Harris *et al.*, 2007**).

I-1-6 Milieux de culture des Mycobactéries

Au cours de ce siècle, de nombreux milieux de culture ont été développés dans le but de cultiver les Mycobactéries. Les plus anciens étaient des formulations à base d'œuf comportant un milieu de Löwenstein-Jensen et un milieu de Petragnani. Dubos et Middlebrook ont joué un rôle déterminant dans l'élaboration d'un certain nombre de formulations contenant de l'acide oléique et de l'albumine en tant que principaux ingrédients destinés à favoriser la croissance du bacille de la tuberculose et à protéger les microorganismes contre divers agents toxiques **(Dubos *et al.*, 1947, Middlebrook *et al.*, 1958 ; 1960)**.

Certaines Mycobactéries ne poussent pas sur milieux ordinaires et exigent pour leur croissance :

- une source d'azote (asparagine ou acide glutamique)

- une source de carbone (glycérol ou pyruvate)

- des sels (phosphates, magnésium, potassium, citrate de fer...).

Les milieux de croissance usuels sont les milieux à l'œuf, les milieux gélosés et les milieux liquides.

➢ **I-1-6-1 Culture sur milieux à l'œuf (poule)**

Il s'agit de milieux opaques, obtenus par coagulation à +55°C pendant 55 minutes et contenant du vert malachite à 0,025% pour inhiber la croissance des germes contaminants ; pour les échantillons très contaminés, on peut les utiliser additionnés d'antibiotiques comme l'acide nalidixique ou la pénicilline G. Sur ces milieux, les colonies de Mycobactéries apparaissent lisses (S) ou rugueuses (R), c'est-à-dire dysgoniques ou eugoniques, de teinte blanchâtre, crème beige ou pigmentées.

I-1-6-1-1 Milieu de Löwenstein-Jensen

A base de sels minéraux, asparagine, glycérine, jaunes d'œufs, vert malachite, c'est le milieu de référence. Il sert à l'isolement (primoculture) des Mycobactéries à partir des produits pathologiques. Additionné de pyruvate, il permet l'identification du complexe tuberculosis (*M tuberculosis, M bovis, M africanum*).

I-1-6-1-2 Milieu de Coletsos

Beaucoup plus riche que le milieu de Löwenstein-Jensen, le milieu de Coletsos, composé d'œufs entiers, de glycérol et dans certains cas d'osséine, est un milieu sélectif, riche, recommandé pour l'isolement des Mycobactéries particulièrement exigeantes (*M bovis*). Il permet une culture rapide et abondante avec des colonies plus volumineuses que sur Löwenstein-Jensen.

L'avantage de ces milieux à l'œuf est leur sensibilité, l'aspect caractéristique des colonies et leur faible prix de revient. Les inconvénients sont : leur qualité variable, la conservation de courte durée (1 à 3 mois) au froid et leur opacité qui ne permet pas d'observer précocement les colonies.

- **I-1-6-2 Culture sur milieux gélosés**

Par la suite, Middlebrook et Cohn ont amélioré la formulation de la gélose acide oléique albumine et ont obtenu une croissance plus rapide et plus abondante de *Mycobacterium* spp. sur leur milieu, désigné sous l'appellation 7H10. Il a été rapporté que ce dernier a moins tendance à favoriser la croissance des contaminants que les milieux à base d'œuf couramment utilisés pour la culture des Mycobactéries (**Dubos *et al.*, 1947, Middlebrook *et al.*, 1958 ; 1960, Kubica *et al.*, 1967**).

Les tubes destinés à la culture sont mis à incuber à 37°C et à 30°C sur des portoirs spéciaux, en position inclinée. Les tubes ne sont fermés complètement qu`après évaporation du liquide, le milieu devant être sec mais non desséché pour que les Mycobactéries puissent s`y développer. Les milieux doivent être mis à incuber 8 semaines au moins et jusqu`à 12 semaines (**Carbonelle, 2003**). C`est un milieu sensible et d`un prix de revient modéré. Toutefois, la lecture des tubes est exclusivement visuelle. La surveillance est journalière la première semaine d`incubation, permettant de visualiser les tubes contaminés et de détecter les MNT à croissance rapide. Ensuite, la lecture se fait une fois par semaine.

En cas de cultures positives, le nombre de colonies isolés est noté permettant de suivre l`efficacité d`un éventuel traitement.

-

➢ I-1-6-3 Culture sur milieux liquide

L`ensemencement en milieu liquide peut se faire à l'aide de différents milieux. Le plus utilisé est le milieu MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*, BD). Ce milieu doit être additionné d`un mélange de facteurs de croissance : OADC (O : acide oléique, A : albumine bovine, D : dextrose, C : catalase) ; il est rendu sélectif par un mélange d'antibiotiques : PANTA (P : polymyxine B, A : amphotericine B, N : acide nalidixique, T : trimethoprime, A : azlocilline) afin d'empêcher la croissance de la flore pulmonaire bactérienne et fongique.

Ce milieu liquide est un milieu Middlebrook 7H9 modifié contenant un composé fluorescent, le sel de ruthénium, incorporé à la pastille de silicone au fond du tube. Cette substance émet une fluorescence d'autant plus vive que la pression partielle en oxygène diminue dans le milieu (**Carbonelle, 2003**).

Initialement, la grande quantité d`oxygène dissous inhibe les émissions du composé. Les micro-organismes, en se multipliant et en respirant, consomment l`oxygène du milieu et permettent l`observation de la fluorescence, grâce à un transilluminateur UV, dont l'intensité est proportionnelle au niveau de réduction du milieu. L'incubation des tubes MGIT se fait à 37°C pendant 42 jours. La croissance peut être révélée de façon manuelle en plaçant le tube sous une lumière ultraviolette ou grâce à l`utilisation d`un automate tel que le MGIT 960¨ Becton Dickinson¨ (dont la lecture se fait automatiquement toutes les 60 minutes (**Carbonelle, 2003**). Cette technique permet une détection de croissance en temps réel et a montré sa supériorité par rapport à des cultures en milieu solide, notamment en réduisant le délai de culture (**Carbonelle, 2003**). Toutefois, le milieu liquide ne permet ni l`observation de colonies ni leur dénombrement qui est parfois préjudiciable à l`établissement du diagnostic, au suivi de l`efficacité d`un traitement et à la détection de cultures mixtes de Mycobactéries. Les deux types de milieux, liquides et solides, sont donc complémentaires et la sensibilité du diagnostic final est améliorée.

I-1-7 Méthode de culture des Mycobactéries

Toutes les méthodes de cultures reposent sur l'élimination des microorganismes non mycobactériens en utilisant les facultés de résistance des Mycobactéries à certains antibiotiques et aux composés acido-basiques. La particularité de la paroi rend les Mycobactéries imperméables aux colorants usuels et est utilisé lors d'un examen microscopique. Toutes les Mycobactéries sont des BAAR, mais toutes les bactéries

acido-résistantes ne sont pas des Mycobactéries. En effet, les *Nocardia*, quelques *Actinomycetes* et quelques corynebactéries sont des bactéries faiblement acido-résistantes (**Carbonelle, 2003**).

La paroi confère également une résistance naturelle aux désinfectants classiques, pouvant être à l'origine de contaminations transmises par l'utilisation d'endoscopes nettoyés par ces produits. Elle résiste aussi aux agents chimiques tels que les solutions acides ou alcalines et les détergents antiseptiques. Cette propriété est mise à contribution avant la mise en culture des produits pathologiques pour éliminer la majorité des bactéries commensales sensibles à ces produits (**Denis, 2007**). Les Mycobactéries restent cependant sensibles à la stérilisation par autoclavage. Des détergents comme le Tween 80 sont souvent ajoutés au milieu de culture afin de réduire la formation d'agrégats et stimuler la croissance. En fonction des milieux solides de culture utilisés, les différentes espèces de Mycobactérie donnent des colonies lisses ou rugueuses, qui s`étalent progressivement (colonie eugonique) ou non (colonie dysgonique). Certaines espèces produisent des pigments caroténoïdes non diffusibles à la lumière, dans ce cas on parle d`espèce photochromogène ou à l'obscurité, espèce scotochromogène, et d'autres non (espèce achromogène) (**Euzéby, 2010**). De nombreuses espèces forment des colonies blanchâtres ou Crèmes, mais surtout parmi les Mycobactéries à croissance rapide, il y a aussi de nombreuses espèces formant des colonies jaunes ou orange vif contenant des pigments caroténoïdes (**David, 1989)**. Notons que les méthodes de quantification des MNT 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.

I-1-8 Identification d`une Mycobactérie

➢ I-1-8-1 Caractères biochimiques

L'identification biochimique des MNT en microbiologie clinique repose sur la classification de Runyon (**Timpe & Runyon, 1954**), qui est basée sur la vitesse de croissance et sur la pigmentation que prennent les souches dans différentes conditions. A l`issue de cette étape, le diagnostic s`oriente, soit vers une mycobactérie du complexe tuberculosis, soit vers une Mycobactérie Non Tuberculeuse. La température de croissance est aussi un critère bactériologique pour classer les Mycobactéries. Elle varie de 30°C (ex : *M. Abscessus*) a 42°C (exemple : *M. xenopi*), voire jusqu'à 45°C (**Murray, 1995**). Que la culture ait été obtenue sur milieu solide ou liquide, le premier stade de l`identification consiste à vérifier le

caractère acido-alcoolorésistant des bactéries par coloration de **Ziehl**. Dans cette technique, la fuchsine colore en rouge les bacilles qui conservent cette coloration après traitement par l`acide nitrique ou sulfurique dilué et par l`alcool. Le fond de la préparation est ensuite coloré au bleu de méthylène. Les bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) apparaissent rouges sur fond bleu. La lecture se fait à l`objectif à immersion (x100).

Le second stade a pour but de différencier les Mycobactéries du complexe *tuberculosis* des autres Mycobactéries. L`identification repose sur les tests phénotypiques (culturaux et biochimiques) mais qui sont de plus en plus remplacés par les tests génotypiques. C'est cette méthode qui est toujours utilisée pour caractériser les nombreuses espèces de MNT qui continuent à être décrites actuellement. Concernant l'identification des MNT par la classification de **Runyon**, après avoir déterminé le groupe de MNT auquel appartient la souche à identifier, 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.

- Recherche de la production de catalase et mise en évidence de sa thermorésistance (après 15 mn à 70°C)
- Recherche de la production de nitrate réductase
- Production de niacine
- Résistance à différentes substances (acide para amino-salicylique, acide thiopène carboxylique, cyclosérine).

Pour une Mycobactérie à croissance lente, son identification peut nécessiter plusieurs semaines. La caractérisation biochimique des nouvelles espèces de MNT s'accompagne aussi de la caractérisation des acides mycoliques de la paroi mycobactérienne. (**Butler et Kilburn, 1990 ; Butler *et al.*, 1991 ; Duffey & Guthertz, 1992 ; Raffi *et al.*, 1992 ; Guthertz *et al.*, 1993 ; Cage, 1994 ; Duffey *et al.*, 1996**).

➢ I-1-8-2 Caractère morpho-tinctorial

Les colonies sont lisses (S) ou rugueuses (R), eugoniques (colonie qui s'étale progressivement) ou dysgoniques (colonies minuscules qui ne s'étalent pas), non pigmentées ou produisant des pigments caroténoïdes non diffusibles (dans ce dernier cas, on distingue les espèces photochromogènes (pigmentation apparaissant seulement lorsque la culture est réalisée à la lumière) et les espèces scotochromogènes (pigmentation également visible après culture à l'obscurité). Certaines espèces n'ont jamais pu être cultivées *in vitro* (*Mycobacterium*

leprae) ou ne sont que très difficilement cultivables (*Mycobacterium genavense, Mycobacterium lepraemurium*).

Les Mycobactéries du complexe *tuberculosis* produisent une catalase thermolabile. L'activité catalasique du complexe *avium-intracellulare* est faible (0,1 à 0,3 mm de mousse). Toutes les Mycobactéries atypiques produisent une catalase thermostable sauf *M. gastri, M. malmoense, M. mageritense, M. botniense* et *M. fallax*. Ces tests sont souvent longs, de lecture difficile et les différences entre espèces sont parfois faibles. Actuellement, ces méthodes sont donc avantageusement remplacées par des techniques de biologie moléculaire (**Carbonelle, 2003**).

- **I-1-8-3 Identification génotypique**

Plusieurs techniques sont actuellement disponibles pour éliminer une Mycobactérie du complexe *tuberculosis* :

- **Technique d`hybridation en milieu liquide** : une sonde monospécifique (*Mycobacterium tuberculosis* complex, Accuprobe¨) d`ADN complémentaire d`ARNr 16S marqué par un ester d`acridinium est mise en présence d`un lysat de culture préparé à partir de milieux liquides ou solides. Après hybridation avec l`ARN ribosomal et élimination des fragments de sondes non hybridés, la sonde hybridée est détectée par chimioluminescence à l`aide d`un luminomètre. Cette sonde présente une très bonne sensibilité (100%) et spécificité (proche de 100%). Cette sonde permet d`établir rapidement que la souche isolée appartient ou pas au complexe *tuberculosis* (**Denis, 2007; Maugein, 2007).**

- **Technique immunochromatographique**: détection de la protéine immunogénique MPT64 spécifique des Mycobactéries du complexe *tuberculosis,* grâce à des anticorps monoclonaux de souris anti-MPT64 (**Denis, 2007; Maugein, 2007)**.

- **PCR spécifique**: détection par amplification génique d`un gène spécifique des Mycobactéries du complexe *tuberculosis* (ex : fragment du gène de la protéineimmunogénique MPT64 nommé MPB64) **(Denis, 2007; Maugein, 2007).**

La seconde étape consiste à identifier la Mycobactérie. Il existe d'autres méthodes classées en trois groupes selon leur spectre d`identification : les sondes monospécifiques, les systèmes après amplification et hybridation sur un support solide, les systèmes basés sur une amplification puis un séquençage ou une restriction enzymatique. Certaines de

ces techniques sont commercialisées, d'autres sont réservées à des laboratoires spécialisés. Elles peuvent être réalisées à partir de culture liquide ou solide.

- **Sondes monospécifiques** *(GenProbe,* BioMérieux*)*

Il s`agit d'une technique d`hybridation directe réalisée à l`aide de sondes ADN complémentaires de cibles d'ARNr 16S. Les sondes disponibles permettent l`identification de *M. avium, M. intracellulare, M. kansasii* et *M. gordonae*. Cette technique a l`avantage d`être rapide (2 heures), d`un faible coût et de nécessiter d'un appareillage simple. La spécificité est bonne, comprise entre 93,4 % et 100 % selon les auteurs mais le nombre d'espèces identifiées est limité (**Carbonelle, 2003**).

- **Systèmes de détection après amplification et hybridation sur support solide**

Ils sont capables d`identifier, selon les kits disponibles, entre 10 et 28 espèces mycobactériennes (INNO-LiPA Mycobacteria¨, Innogenetics ; GenoType¨ Mycobacterium, Biocentric). Seul le kit Genotype¨ *Mycobacterium* CM (Common Mycobacteria) permet l`identification des Mycobactéries du complexe *abscessus.* Après amplification par PCR de la région intergénique 16S-23S ARNr et marquage des amplicons à la biotine, ces amplicons sont hybridés à des sondes spécifiques placées en parallèle sur une bandelette de nitrocellulose. La révélation des amplicons se fait par l`addition de streptavidine phosphatase alcaline qui colore en violet les zones de fixation. Ce sont des méthodes très sensibles, permettant d`identifier un grand nombre de MNT mais qui nécessitent plus de temps et un matériel plus complexe que dans le cas d`Accuprobe (**Carbonelle, 2003**).

- **Systèmes de détection universelle fondés sur l'amplification puis la restriction enzymatique du gène *hsp65*** (méthode PRA : PCR Restriction Enzyme Analysis) (**Telenti, 1993**)

Il s`agit d`une méthode basée sur le polymorphisme de restriction du gène *hsp65.* Ce gène code une protéine de choc thermique universelle de 65kD. Le gène *hsp65* est un gène bien conservé au cours de l`évolution qui contient des séquences communes au genre *Mycobacterium* mais aussi des séquences spécifiques d'espèce. L'utilisation d'amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* permet l'amplification de 439 paires de bases. Les amplicons obtenus sont soumis à une double digestion enzymatique, d`abord par *Bst*EII puis par *Hae*III. Des fragments de taille variée sont obtenus à partir de différentes espèces. La taille des fragments est déterminée après séparation par électrophorèse en gel d'agarose.

La prise en compte de la taille des fragments obtenus après digestion avec *Bst*EII puis de la taille de bandes obtenues après restriction par *Hae*III permet d'identifier une cinquantaine d'espèces de Mycobactéries. C'est une technique rapide et peu coûteuse.

- **Systèmes de détection universelle fondés sur le séquençage**

Le séquençage du gène *hsp65* constitue une alternative et est réalisée avec les mêmes amorces. Le séquençage de l'ARNr 16S permet d'identifier la majorité des souches d'intérêt médical après comparaison de la séquence obtenue à des banques de données disponibles sur internet. Les positions 590-609 et 182-202 sont respectivement spécifiques de genre et d`espèce (**Denis, 2007**). Le séquençage d'autres gênes (*rpoB, secA, sodA, recA*) est possible, mais les banques de données concernant ces cibles sont incomplètes (**Carbonelle, 2003**).

- **Spectrométrie de masse**

Dernièrement, des études ont montré que la spectrométrie de masse (MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight) pouvait être utilisée en microbiologie clinique pour l`identification des Mycobactéries à partir d`un milieu de culture solide (**El Khechine, 2011; Saleeb, 2011**). La spectrométrie de masse permet l'étude du déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques et peut permettre l'identification des micro-organismes grâce à l'analyse de leurs protéines ribosomales et membranaires, empreintes digitales de la bactérie. Les ions générés à partir des protéines d'une colonie finement étalée sur la cible en acier, sont séparés en fonction de leur temps de vol (TOF). Pour chaque groupe d'ions de même rapport *m/z* (masse/charge ionique), un signal est enregistré au niveau du détecteur sous la forme d'une fonction temps/intensité, l'ensemble des pics ainsi enregistrés constituant un spectre de masse . Les spectres générés à partir de bactéries entières sont ensuite comparés aux spectres de référence présents dans la base de données d'un système expert. Cette technique permet une identification rapide, précise et fiable des bactéries. La spectrométrie de masse est peu coûteuse en consommables mais son cout à l'investissement et les contrats de maintenance sont élevés comparativement aux autres automates de laboratoire. L'identification des bactéries dépend de la richesse de la base de données.

I-1-9 Caractéristiques génétiques des Mycobactéries

La comparaison des génomes de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* et MAP, montre que ces dernières 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 :

➢ I-1-9-1 Importance des capacités codantes

Mise à part *M. leprae* qui possède un génome de plus petite taille que les autres Mycobactéries, il est a noté que les génomes des espèces du MTC et des MNT ont une capacité codante importante allant, par exemple, de 92,4 % pour *M. smegmatis* à 73,4 % pour *M. ulcerans* (**Randomski *et al.,* 2010**).

➢ I-1-9-2 Variabilité des capacités de mutabilité

➢

Les espèces pathogènes intracellulaires strictes au sein des Mycobactéries, à savoir celles responsables de la lèpre et de la tuberculose, auraient 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 MNT, ainsi que leur taille de génome relativement plus importante que les espèces pathogènes intracellulaire strictes (**Fogel *et al.,* 1999**), suggèrent qu'elles ont une muabilité 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**).

➢ I-1-9-3 Possibilités de transferts horizontaux de gènes

Des éléments de prophages sont détectables dans les génomes des MNT *M. abscessus*, *M. marinum* et *M. ulcerans* qui en contiendraient respectivement 4, 10 et 2 (**Ripoll *et al.,* 2009**).
La comparaison de l'ensemble du génome de certaines espèces de MNT étant désormais possible depuis les récents projets de séquençage. L'une de ces études souligne que l'absence

de gène codant pour des enzymes de restriction de l'ADN dans le génome 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 MNT 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 MNT 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 MNT 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 cystiques comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* (**Ripoll *et al.*, 2009**).

Ces gènes codent la biosynthèse du colorant bactéricide phénazine et de l'acide phénacétique, ainsi que des processus de dégradation de l'ADN (**Ripoll *et al.*, 2009**).

➢ I-1-9-4 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, pouvait expliquer leur faible vitesse de

croissance (**Cole *et al.,* 1998**). Cette observation était faite suite au séquençage de la totalité du génome de la MNT 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**).

➢ I-1-9-5 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.
Cependant, 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 Kempsell *et al*. pour l'espèce de référence *M. tuberculosis* (**Kempsell *et al.,* 1992**). C'est en ce sens que la recherche des différences entre les Mycobactéries à croissance lente et rapide s'est focalisée sur l'opéron ribosomique (**Figure 2**).

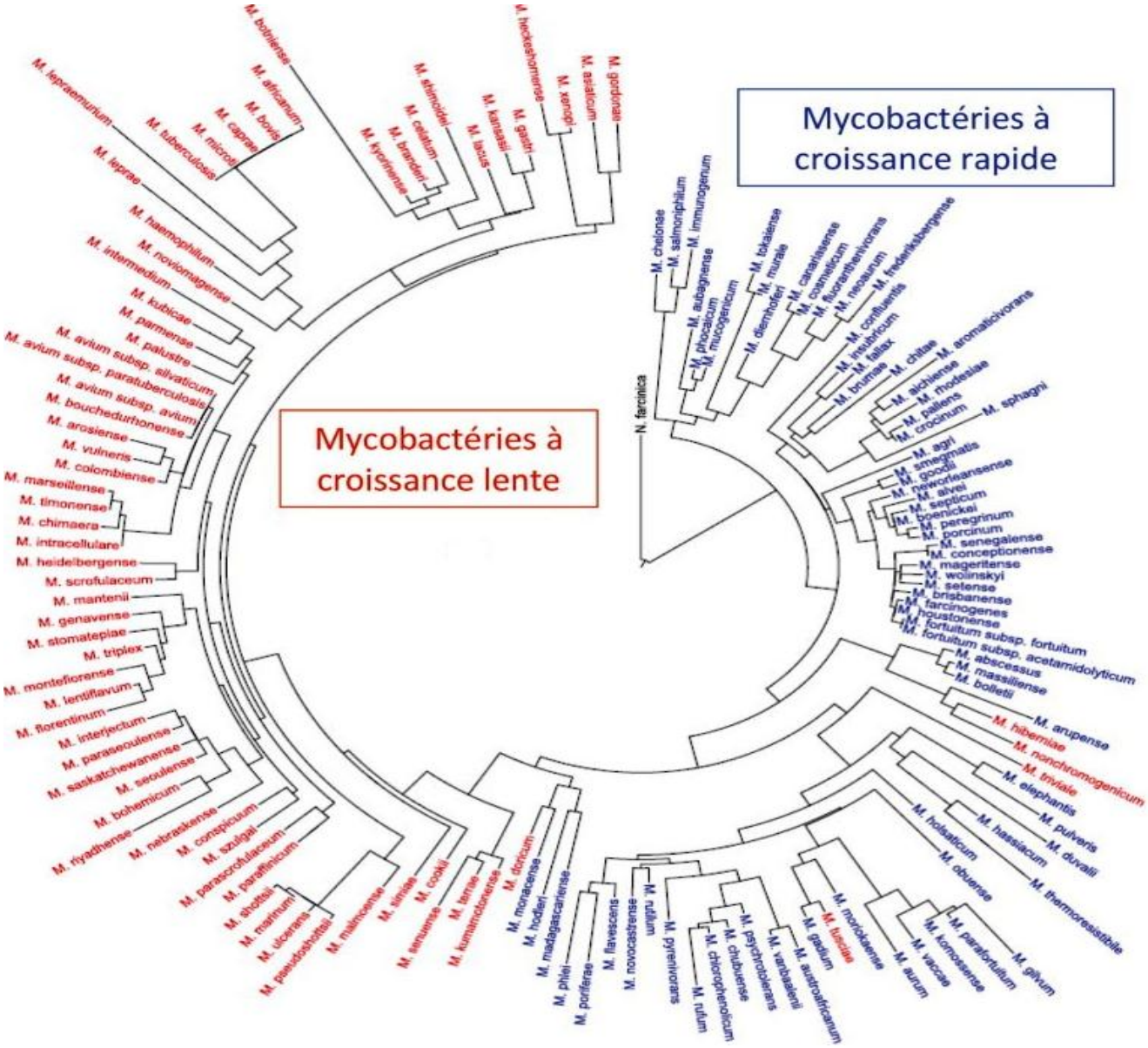


Figure 2 : **Relation phylogénétique entre les séquences du gène *hsp65* chez les Mycobactéries**. **(Dai *et al.*, 2011)**

➢ I-1-9-6 Faiblesse des copies de l'opéron ribosomique

Alors qu'aucune différence n'est remarquable entre la taille des génomes des MNT à croissance rapide et lente, la majorité des MNT à croissance lente ne possèdent qu'une seule copie de l'ARNr 16S, et la majorité des Mycobactéries à croissance rapide possèdent deux (**Bercovier *et al.*, 1986**). Certaines exceptions sont à noter comme les MNT à croissance rapide *M. chelonae*, *M. abscessus* et *M. alvei* qui possèdent une copie de l'ARNr 16S (**Domenech *et al.*, 1994 ; Menendez *et al.*, 2002**), et les MNT 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.*, 2002**). 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 *rrn*A, et est situé en aval du gène *murA* (UDP-NAGtransferase) 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* (tyrosyltRNAsynthetase) 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 MNT 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).

➢ I-1-9-7 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. 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 MNT 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 MNT 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*. 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**).

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 (**Stahl & Urbance, 1990 ; Shinnick & Good, 1994**). 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 Kempsell *et al.* pour l'espèce de référence *M. tuberculosis* (**Kempsell *et al.*, 1992**). C'est en ce sens que la recherche des différences entre les Mycobactéries à croissance lente et rapide s'est focalisée sur l'opéron ribosomique. 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**). Une proportion significative de MNT isolées de l'environnement n'appartient pas à des espèces mycobactériennes généralement décrites (**Pickup *et al.*, 2005**).

I-1-10 Les Mycobactéries à travers le monde

Même si l'Organisation Mondiale pour la Santé a déclaré les MNT 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 MNT. 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 (5336 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. Néanmoins, en 2006, 2007 et 2008, le réseau Azay de surveillance des mycobactérioses en

France **(Maugein & Bauriaud, 2009)** a recensé respectivement 242, 207 et 231 cas au niveau de 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*. On estime à au moins 5000 cas de mycobactérioses en France en 2007 (**Randomski *et al.*, 2010**). Une autre Mycobactérie, *M. abscessus* se trouve de façon endémique dans la région sud des Etats-Unis, comme le Texas ou la Floride, mais elle est retrouvée géographiquement dans le monde entier. Sans relier ces cas à une contamination d'origine hydrique, des formes très particulières de mycobactérioses ont été observés 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'autre infections diverses en Zambie provoquées par *M. lentiflavum* et *M. intracellulare* (**Buijtels & Petit, 2005**). En Afrique de l'Ouest, précisément en Côte d'Ivoire, la mycobactériose prédominante est l'Ulcère de Buruli, dont l'agent responsable est *Mycobacterium ulcerans*.

I-1-11 Infections à Mycobactéries

On compte plus de 100 espèces de Mycobactéries, la plupart sont à l'origine non pathogènes (**Hale *et al.*, 2001; Rastogi *et al.*, 2001**). Cependant, le genre *Mycobacterium* renferme des espèces réputées pathogènes aussi bien pour l'homme que pour l'animal (**Howard *et al.*, 1949**), ainsi que des espèces opportunistes et saprophytes généralement qualifiées d'atypiques, anonymes ou encore, espèces non tuberculeuses (***American Thoracic Society*, 1997**). De nombreuses espèces de Mycobactéries atypiques ou pathogènes pour les animaux sont à l'origine d'infections humaines opportunistes. Ces Mycobactéries sont responsables d'affections pulmonaires, d'adénites, de lésions cutanées mais aussi d'affections généralisées dont la fréquence augmente avec la multiplication des cas de SIDA (**Kiehn *et al.*, 1985; Damsker & Bottone, 1985**).

Aux USA, de nombreuses études rapportent des cas d'infections cutanées ou des furonculoses chez des personnes immunocompétentes, provoquées par des MNT 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**). Les mycobactérioses humaines ne se distinguent ni par la clinique ni par l'anatomo-pathologie des tuberculoses à *M. tuberculosis* ou à *M. bovis*. Dans la majorité des cas, elles

s'installent chez des patients présentant un déficit localisé ou généralisé de l'immunité (**Grosset & Sors, 1984**).

La littérature nous présente plusieurs types de mycobactérioses :

- **Mycobactérioses pulmonaires** : Elles frappent habituellement des sujets masculins, âgés de plus de 40 ans. Les germes en cause sont *M. avium intracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, très rarement, *M. szulgai*; *M. malmoense*, *M. fortuitum* et *M. chelonei*.
- **Mycobactérioses ganglionnaires** : Elles affectent les enfants en-dessous de 8 ans chez qui elles provoquent des adénites froides dont le tout premier agent est *M. scrofulaceum*. Les adénites à *M. avium-intracellulare* sont moins fréquentes et touchent des enfants plus âgés.
- **Autres mycobactérioses**: *M. fortuitum* et *M. chelonei* sont responsables d'abcès et de certaines infections ostéo-articulaires. Les infections cutanées sont dues dans les pays tempérés à *M. marinum*, et dans les pays tropicaux à *M. ulcerans*. La fréquence des infections généralisées, habituellement à *M. avium-intracellulare*, augmente régulièrement en même temps que se multiplient les cas de SIDA (**Brettle, 1997; Low *et al.*, 1997**).

Le complexe *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi* et *M. chelonae* sont responsables de la majorité des infections dans les pays développés (**Horsburgh, 1996**) alors que *M. ulcerans* est responsable de maladies ulcérantes endémiques dans les pays tropicaux et subtropicaux (**Pedley *et al.*, 2004**). L'invasion tissulaire est souvent fréquente chez les personnes prédisposées suite à une réponse immunitaire locale ou systémique déficiente (**Falkinham *et al.*, 1996 ; Nichols *et al.*, 2004**).

La mycobactériose majeure sur le globe selon la littérature, serait provoquée par *M. kansasii* (**Falkinham, 1996**). Il s'agit d'un pathogène pulmonaire très fréquent affectant souvent des individus présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente comme une silicose, un cancer du poumon (**Manfredi *et al.*, 2004).** *M. abscessus* est egalement une des principales Mycobactéries responsables d'infections iatrogènes sporadiques et épidémiques, souvent liées à la présence de matériel inerte. La transmission se ferait par ingestion, aérosolisation et par effraction cutanée. Les infections post-opératoires, après chirurgie plastique, cardiaque ou orthopédique, représentent près de 45 % des pathologies extra pulmonaires liées à *M. abscessus* (**Wallace, 1998**). *M. abscessus* produit souvent des infections de la peau et des tissus mous avec formation d'abcès ou de nodules cutanés, apparaissant souvent après un traumatisme ou une procédure chirurgicale avec du matériel infecté (**Griffith *et al.*, 2007)**. *M. fortuitum* produit également des nécroses des tissus en Finlande (**Lehtinen *et al.*, 2005**),

ainsi que d'autres infections diverses en Zambie provoquées par *M. lentiflavum* et *M. intracellulare* (**Buijtels & Petit, 2005**). En Afrique de l'Ouest, précisément en Côte d'Ivoire, la mycobactériose prédominante est l'Ulcère de Buruli, dont l'agent responsable est *Mycobacterium ulcerans*. C'est la 3eme mycobactériose après la tuberculose et la lèpre dans le monde, mais elle occupe la 2eme place mycobactérienne après la tuberculose et avant la lèpre en Côte d'Ivoire (**Olivia, 2004 ; Wansbrough-Jones & Phillips, 2006**).

M ulcerans fait partie des 3 principales espèces du genre *Mycobacterium* pathogène pour l'homme et les animaux. C'est un véritable problème de santé publique en Côte d'Ivoire.
Le pouvoir pathogène des Mycobactéries environnementales est très variable. A la suite de comparaisons phylogénétiques, *M. ulcerans,* agent responsable de la mycobactériose la plus populaire en Côte d'Ivoire, serait presqu'identique de *M marinum,* mycobactérie responsable d'infection chez le poisson. Cela est dû à l'acquisition par *M. ulcerans* d'un plasmide PMUM001 qui porterait les gènes de la biosynthèse d'une toxine appelée mycolactone (**Stinear *et al.,* 2004**).
En effet, outre l'Ulcère de Buruli causé 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 MNT causent dans l'hémisphère nord des infections cutanées.
Aux USA, de nombreuses études rapportent des cas d'infections cutanées ou des furonculoses chez des personnes immunocompétentes, provoquées par des MNT ayant contaminé l'eau d'un centre 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 & Sanchez, 2004**).

➢ I-1-11-1 Facteurs prédisposant aux infections à MNT

Les facteurs prédisposant aux infections à MNT sont multiples. Les patients présentant des anomalies génétiques affectant l`immunité innée et adaptative ont une sensibilité accrue à ces infections. Le fonctionnement optimal des lymphocytes T CD4+ et des macrophages est extrêmement important pour la défense contre les Mycobactéries. Ainsi, les personnes atteintes par le virus de l`immunodéficience humaine (VIH) sont des personnes à risque de développer une infection à MNT (**Doffinger, 2006**).

Les malades atteints de mucoviscidose constituent un groupe à risque d`infection à MNT. Les raisons ne sont pas claires, hormis les facteurs dues à la maladie elle-même, en particulier respiratoires, telles que la bronchectasie et la diminution de la clairance mucociliaire, prédisposant aux infections pulmonaires, y compris aux MNT. Généralement, l`infection est lentement progressive, mais elle peut devenir fulminante (**Griffith, 2007**) chez des patients atteints de mucoviscidose.

➢ I-1-11-2 Toxine des Mycobactéries

La toxine la plus connue est celle secrétée par *M ulcerans* appelée Mycolactone. Elle a été découverte en 1998 par Georges *et al.* (**1998 ; 1999**). Sa formule brute est la suivante : $C_{44}H_{70}O_{9.}$ C`est un composé lipidique appartenant à la classe des Macrolides dérivés de polyketides. Par définition, les Macrolides sont des molécules à propriétés antibiotiques, qui ont des macrocycles de lactone souvent associés à des sucres neutres ou aminés. Elles constituent une famille d'antibiotiques capables de diffuser dans les tissus, voire à l'intérieur des cellules. Les polykétides sont des métabolites secondaires de bactéries, champignons, végétaux et animaux qui proviennent de la condensation itérative de sous-unités acétyle ou malonyle par des enzymes spécialisées, les polykétides-synthases PKS. Un plasmide géant d´environ cent soixante- quatorze paires de bases (174 pb) pMUM001 présent dans le génome de la bactérie porterait les gènes de la Polykétide Synthétase (PKS), responsables de la synthèse de la toxine **(Stinear *et al.*, 2004)**. Ce plasmide de virulence porterait un ensemble de 3 grands gènes : *mlsA1*, *mlsA2* et *mlsB* de taille respective 51Kb, 7,6Kb et 43Kb **(Stinear *et al.*, 2004 ; 2005)**. Cet ensemble de gènes coderait pour la synthèse de polyketides synthétases de type I impliqués dans la synthèse des mycolactones A et B (**Figure 3**) **(Stinear *et al.*, 2005)**. En effet, Il existerait plusieurs types de mycolactone en fonction des origines géographiques des souches de *M. ulcerans*. Les souches isolées des zones endémiques africaines sont majoritairement productrices d`un mélange de Mycolactone A et B, tandis que les isolats australiens produisent surtout la Mycolactone C et les isolats asiatiques, la Mycolactone D. Cette hétérogénéité de structure de la Mycolactone a une implication considérable dans la virulence de la Mycobactérie. Les Mycolactones C et D étant beaucoup moins actives que les Mycolactones A et B **(Ranger *et al.*, 2006 ; Hui Hong *et al.*, 2005**. Les souches de *M. ulcerans* isolées des zones endémiques africaines seraient les plus virulentes en tenant compte de l´aspect des lésions et celles de Malaisie et du japon sont majoritairement productrices d'un mélange de mycolactone A et B, lesquels sont des isomères chimiques de

conformation Z et E. Leur structure complète a été confirmé par synthèse chimique grâce aux travaux de Benowitz et Fidanze **(Benowitz *et al.,* 2001 ; Fidanze *et al.,* 2001)**. Les isolats australiens produisent surtout la mycolactone C et les isolats asiatiques particulièrement de Chine, la mycolactone D **(Mve-Obiang *et al.,* 2003)**. Récemment, d`autres toxines apparentées furent découvertes chez d`autres Mycobactéries isolées de l`environnement telles que *M. liflandii*, productrices de la mycolactone E, *M marinum et M pseudoshotsii*, productrices de la Mycolactone F (**Ranger *et al.,* 2006 ; (Hui Hong *et al.,* 2008) ; Marion *et al.,* 2012**). Elles ont été nommées à cet effet, Mycobactéries productrices de mycolactone (MPM). *M ulcerans* est la seule pour laquelle la virulence dépende exclusivement de la sécrétion de cette toxine.

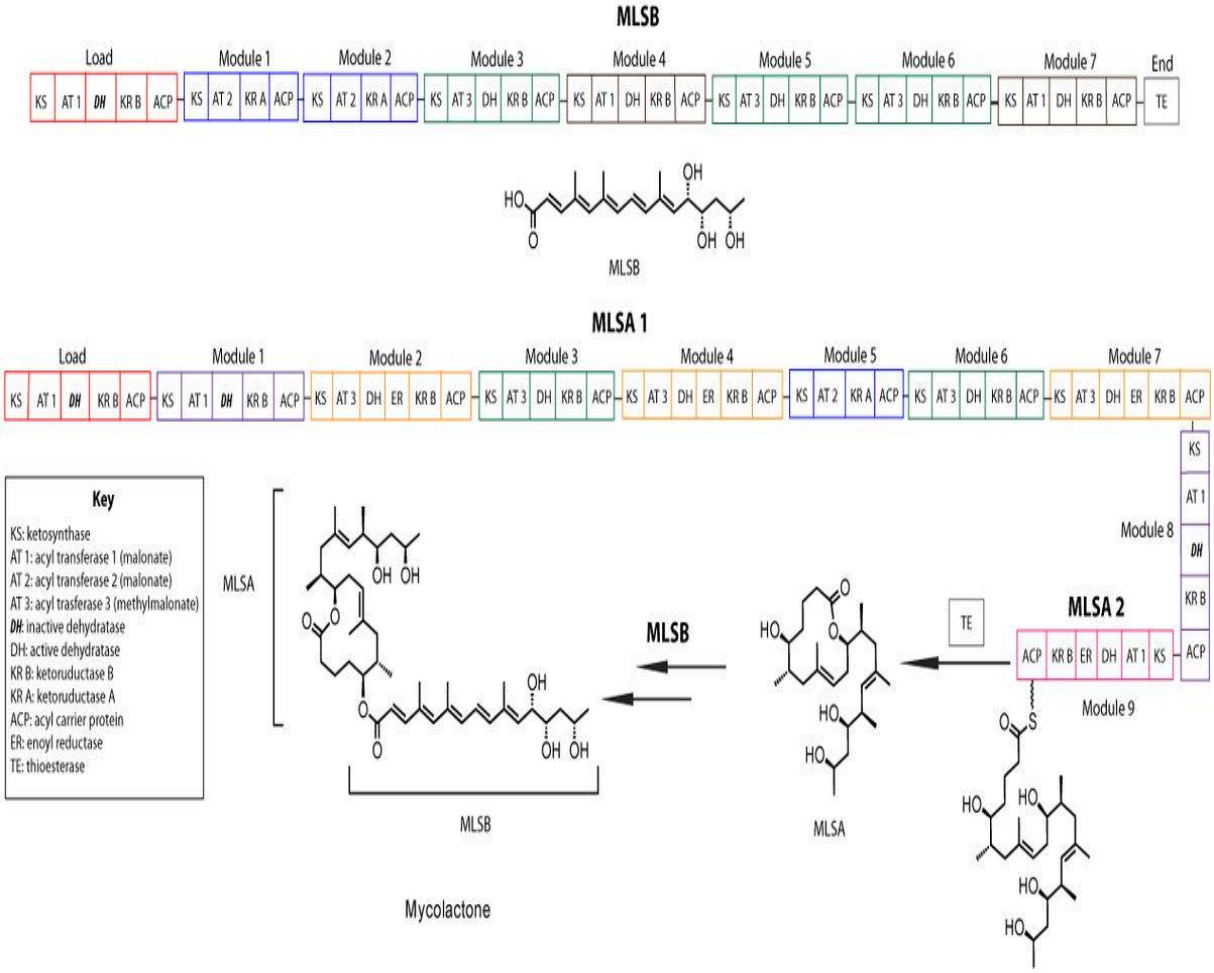


Figure 3 : Organisation génétique des gènes impliqués dans la synthèse des mycolactones A et B, principalement des polykétides synthétases de type I (Stinear *et al.*, 2005)

I-2 FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

I-2-1 Facteurs climatiques

La communauté scientifique internationale reconnaît de manière unanime que le changement climatique peut avoir des effets sur la santé, même si ceux-ci sont complexes à évaluer (**Arianna de Toni *et al.*, 2009**). Le climat, par son action sur l'eau, peut donc avoir un effet sur ces maladies liées à l'eau et cet effet peut se voir sur les différentes étapes de développement et de transmission des agents dangereux. En effet, les facteurs climatiques peuvent influer non seulement sur la croissance des micro-organismes pathogènes présents dans les écosystèmes aquatiques, mais également sur leur survie, leur pathogénicité, ainsi que sur les types et le nombre d'interactions qu'ils établissent dans le milieu. Une étude dans le Nord du Malawi indique que l'isolement de MNT dans les sols est beaucoup plus fréquent pendant les saisons sèches (95 % des prélèvements d'eau furent positifs) (**Chilima *et al.*, 2006**) (tempérées de Mai à Octobre : 21°C et chaude de Septembre à Novembre : 24°C) que pendant les saisons humides (de Décembre à Avril : 24°C).

I-2-2 Habitats aquatiques et terrestres

Les Mycobactéries non tuberculeuses ou atypiques sont largement distribuées, sous forme libre, dans l'environnement hydro-tellurique (eau, terre, végétaux) dans lequel elles sont capables de survivre et de multiplier. Elles sont capables de se développer dans un large éventail de pH (de 1 à 5), de température (à partir de 28°C et jusqu'à 52°C) en milieu salé. Bland *et al.* (**2005**) ont montré que les conditions extrêmes comme les écosystèmes acides ou les eaux alcalines du Rio Grande favorisent les MNT. Les densités de *M. avium* sont plus élevées dans les eaux peu oxygénées et riches en matière organique (**Falkinham *et al.*, 2004**). Ainsi plusieurs espèces peuvent être isolées d'un même échantillon d'eau naturelle ((**Torkko *et al.*, 2001**, **Niva *et al.*, 2006, Bland, 2005**). Dans une étude, certaines especes ont été isolées d'échantillon d'eau naturelle et d'eau récréationnelle (**Dailloux *et al.*, 2010**). La distribution des espèces couramment isolées est en changement constant dans la plupart des pays étudiés et de nouvelles espèces émergent (**Martin-Casabona *et al.*, 2004**). Un centre expérimental en Angleterre a de plus démontré que le sol pouvait contenir différentes espèces de MNT à croissance rapide proches de *M. fortuitum* mais aussi d'autres à croissance lente

proches de *M. lentiflavum* (**Mendum *et al.*, 2000**). Les Mycobactéries sont robustes et peuvent survivre des années dans les dépôts sédimentaires (**Pickup *et al.*, 2005**).

En milieu hospitalier, l'eau peut être à l`origine d`infections nosocomiales, les Mycobactéries étant résistantes à de nombreux désinfectants (**Euzeby, 2010**). Parmi les nombreuses épidémies, la plus importante jamais décrite est survenue en Colombie (**Villanueva, 1997**). Sur une période de cinq mois, 350 des 2000 patients qui avaient reçu des injections de lidocaïne contaminée par *M. abscessus* dans le cabinet d`un seul médecin ont développé des abcès sous-cutanés ou des cellulites (**Villanueva, 1997**). Des épidémies hospitalières ont également été décrites après hémodialyse, par contamination de l`eau du bain de dialyse ou du fait de l`emploi de matériel réutilisable insuffisamment désinfecté. La chirurgie esthétique (liposuccion, mammoplastie), une autre source de ces infections, a également donné lieu à des épidémies (**Roux, 2010**). Effectivement dans l'eau de rivière d'un bassin versant finlandais, la présence de MNT 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 MNT 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 ± 140 mgO_2/l) et une concentration forte en potassium (**Iivanainen *et al.*, 1993**). Cette étude a également observé une corrélation positive entre le dénombrement des MNT par bactériologie et les concentrations de Fe, Al, Cu, Co et Cr dans l'eau de surface (**Iivanainen *et al.*, 1993**). L'ubiquité des Mycobactéries dans l'environnement, leur formidable capacité d'adaptation font de ces germes des compagnons obligatoires de l'homme. La forte hydrophobicité des Mycobactéries les conduit à se concentrer à l'interface eau/air, où la matière organique se concentre aussi par le même phénomène d'adsorption préférentielle (**Falkinham, 2004**). 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 & Falkinham, 2006**), suggérant que la résistance au chlore des MNT est en partie causée par la formation des biofilms dans les canalisations d'eau potable. 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. 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, activant ainsi les gènes bfrA (bacterioferritin) et bfrB

(ferritin) codant les protéines bactérioferritine et ferritine de stockage du fer, réprimant 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 & Smith, 2003**).

Les MNT se multiplient également 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 MNT (**Niva *et al.*, 2006**). 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 10^7-10^8 Mycobactéries/g, ou 10 à 100 fois moins de Mycobactéries en utilisant les outils classiques de bactériologie (**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**).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants produits par la combustion de la matière organique. Ils peuvent cependant se retrouver dans l'eau et dans le sol (**Harzallah, 2011**). Dans les bassins versants, les sols pollués en HAP, au même titre que les sols non pollués, présentent une grande diversité de MNT. Une étude indique que les sols pollués en HAP (pH de 5,5 à 9,0 ; carbone organique total de 0,8 à 7,0 % ; lipides < 50 mg/kg) contiennent des MNT à croissance rapide métabolisant des HAP, alors que les sols non pollués en HAP (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 MNT métabolisant les HAP (**Leys *et al.*, 2005**). Effectivement, des MNT à croissance rapide sont capables de dégrader de nombreux composés xénobiotiques pouvant être présents dans les sols. Plus précisément, les MNT saprophytes à croissance rapide : *M. anthracenicum*, *M. aromaticivorans*, *M. fluoranthenivorans*, *M. frederiksbergense*, *M. hodleri*, *M. pyrenivorans* et *M. vanbaalenii* sont connues pour dégrader certains HAP comme l'anthracène, le benzopyrène, le benzanthracène, le biphényl, lechrysène, le fluoranthène, le fluorène, le 1-nitropyrène, le phénanthrène et/ou le pyrène. Ces espèces de MNT 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 MNT. Certaines MNT 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. La diversité des espèces de MNT dans les habitats aquatiques est beaucoup plus décrite que celle des habitats terrestres (**Randomski *et al.*, 2010**). Tout comme celle des habitats terrestres, la diversité des MNT 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 (**Randomski *et al.*, 2010).**

I-2-3 Filières de potabilisation

Les espèces de MNT *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. aurum*, *M. gadium*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* et *M. intracellulare* provenant 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**). 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 & 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**).

I-2-4 Réseaux de distribution d'eau potable

Concernant les espèces de MNT 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 & 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 MNT.
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**). Une forte corrélation a été démontrée entre la résistance de *M. avium* et *M. intracellulare* au chlore et l'hydrophobicité des biofilms (**Steed & Falkinham, 2006**), suggérant que la résistance au chlore des MNT 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-2-5 Interactions

L'association des Mycobactéries avec les autres micro-organismes de l'environnement tels que les protozoaires, les végétaux ou les invertébrés serait de type commensal c'est-à-dire qu'elles bénéficient de son hôte sans le nuire, sous forme de source de matière organique ou de facteurs de croissance (**Randomski *et al.*, 2010**). Il est possible que dans certains cas cette association soit de type mutualiste, l'hôte tirant un avantage de la présence de la MNT. 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 MNT. Alors que l'association avec les amphibiens, les reptiles, les mammifères terrestres et les poissons semble parasitaire ou de type commensal (**Randomski *et al.*, 2010**).

I-2-5-1 Avec les protozoaires

Le protozoaire aquatique du genre *Acanthamoeba* semblerait être un hôte environnemental des MNT (**Cirillo *et al.*, 1997 ; Steinert *et al.*, 1998 ; Miltner & 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 & Bermudez, 2000**). D'autre part, il a été démontré in vitro que 26 espèces différentes de MNT avaient la capacité d'entrer dans les trophozoites 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**). Cette capacité des MNT 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 & Bermudez, 2000**) et les cellules épithéliales intestinales humaines (**Miltner & 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 & Bermudez, 2000**).

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 MNT (**Yoder *et al.*, 1999**). 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 MNT n'a, à ce jour, été décrite. Par ailleurs, il serait possible de considérer les algues comme des réservoirs potentiels des MNT. 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**).

I-2-5-2 Avec les insectes aquatiques

Certains insectes pourraient être des réservoirs de MNT. 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**).

I-2-5-3 Association parasitaire ou de type commensal

L'association des MNT avec des vertébrés peut être soit parasitaire ou de type commensal en fonction de l'espèce de MNT considérée ou de l'état physiologique de la bactérie et de l'hôte. Les MNT 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.

I-2-5-4 Avec les poissons

Beaucoup d'espèces de poisson peuvent être des réservoirs de différentes espèces de MNT. *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 *Dicentrarcitus labrax*, *Chaetodon fasciatus*, *Sparus aurata*, *Siganus rivulatus*, *Eretmochelys imbricata*, *Cyprinuscarpio*, *Bidyanus bidyanus* et *Channa striata* peuvent être infectés par des MNT (**Ucko & Colorni, 2005**). D'autre part, parmi les espèces de MNT 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, Gadusmorhua, Genypterus blacodes, Lophius piscatorius*) peuvent contenir des MNT 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 MNT provenaient de l'eau ou du poisson, et aucune mycobactériose humaine d'origine alimentaire n'a, à ce jour, été démontrée. L'association des MNT avec les poissons serait donc parasitaire ou de type commensal en fonction de l'espèce de MNT considérée.

I-2-5-5 Avec les amphibiens et les reptiles

Les MNT 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 MNT 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 & Wallace, 2002**), et se traduit par la colonisation des chairs de l'animal (**Pizzi & Miller, 2005**). Par ailleurs des pathologies cardiovasculaires causées par les MNT sont aussi à noter chez les amphibiens (**Heinz-Taheny, 2009**). Dans l'environnement, d'autres espèces de MNT 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**).

I-2-5-6 Avec les oiseaux

Les oiseaux de différentes espèces sont des réservoirs potentiels de MNT. 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 quedans une moindre mesure, les oiseaux puissent être infectés par les espèces *M. fortuitum*, *M. tuberculosis*, *M. gordonae*, et *M. nonchromogenicum* (**Hoop *et al.,* 1996**).

I-2-5-7 Avec les mammifères terrestres

Les mammifères terrestres sauvages et d'élevage semblent être des réservoirs majeurs des MNT. Par exemple, en France, la MNT *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**). D'autres espèces de MNT peuvent aussi causer des infections chez les animaux sauvages et d'élevage. Par exemple en Egypte, les MNT *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 MNT *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 MNT *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 MNT 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 & Thoen, 1977 ; Khare *et al.,* 2004**).

I-2-5-8 Le rôle écologique

Il n'existe que peu d'informations sur le rôle des MNT 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 MNT présente probablement une faible préférence pour les environnements ammoniaqués et azotés (**Marri *et al.,* 2006**). Néanmoins, aucune donnée ne permet de généraliser cette voie préférentielle de dégradation des acides aminés aux autres MNT. Concernant le cycle du carbone, la littérature souligne néanmoins l'importance des MNT dans l'utilisation des composés hydrophobes, des acides humiques et des lipides.

I-2-5-9 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 MNT (**Leys *et al.,* 2005**). Les MNT saprophytes à croissance rapide sont connues pour dégrader certains PAH comme l'anthracène, le benzopyrène, le benzanthracène, le biphényl, le chrysène, le fluoranthène, le fluorène, le 1-nitropyrène, le phénanthrène et/ou le pyrène. Ces espèces de MNT 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 MNT. 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**). Les MNT capables de dégrader les PAH sont principalement associées à la fraction argileuse des sols (**Uyttebroek *et al.,* 2006**). De plus, la MNT à croissance rapide *M. montefiorense* 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 MNT à croissance lente (**Uyttebroek *et al.,* 2007b**). Sans rapport direct avec la croissance, une MNT proche de *M. diernhoferi* a aussi étédécrite 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 MNT. D'autre part, certaines MNT 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 MNT.

I-2-5-10 Utilisation des composés carbonés biotiques

La croissance des MNT 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 MNT et la matière organique se concentrent dans le même compartiment, à savoir l'interface eau/air (**George & Falkinham, 1989 ; Falkinham *et al.,* 2004**), en raison du phénomène d'adsorption préférentielle due à leur forte hydrophobicité (**Falkinham, 2004**). Dans l'environnement, les MNT 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 MNT en milieu naturel.

Alors que la littérature sur l'utilisation des lipides dans l'environnement par les MNT 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 Δ1-déhydrogènase, codé par le gène *kstR* (3-ketosteroid Δ1-d ehydrogenase), 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 *kstR*2 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.

I-3 OUTILS ANALYTIQUES APPLICABLES AUX ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX

Jusqu'à présent, la recherche sur les MNT 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 MNT 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.

I-3-1 Détection et Quantification des Mycobactéries par microscopie

I-3-1-1 Propriété tinctoriale

La richesse lipidique de la paroi des BAAR, 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 BAAR, 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'autres colorations des BAAR 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 BAAR 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, le genre *Nocardia, Legionella* ou *Corynebacterium* (**Shinnick & Good, 1994**). Ces méthodes de détection par coloration ne permettent donc pas d'identifier les Bacilles Acido-Alcoolo résistants détectés et nécessitent d'autres investigations par bactériologie ou biologie moléculaire. De plus, les seuils de détection et de quantification de ces méthodes sont très faibles (**Woods & Walker, 1996 ; Selvakumar *et al.*, 2006**). En conséquence l'application de ces dernières peut peut-être suffire pour détecter ou quantifier les BAAR dans des échantillons pathologiques très contaminés, mais est peu efficace pour des échantillons environnementaux faiblement contaminés.

I-3-1-2 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 MNT *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.

I-3-2 Détection et Quantification des Mycobactéries 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 MNT 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 MNT dans l'eau.

I-3-2-1 Méthodes de concentration de l'échantillon

La recherche des MNT 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.

I-3-2-2 Milieux d'isolement solide

En raison des exigences métaboliques des MNT, la quantification par isolement de ces dernières nécessite l'utilisation de milieux de culture solide complexes comme le milieu au jaune d'œuf d'Ogawa (Ogawa Egg Yolk medium: OEY), le milieu d'Ogawa à l'ofloxacine éthambutol (ogawa medium ofloxacin ethambutol: OEOE), le milieu sélectif de Falkinham (Falkinham's selective medium: FSM), le milieu de Löwenstein-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 & 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 MNT, en particulier celui des MNT à croissance lente. Ceci est le cas pour des échantillons cliniques, vétérinaires et environnementaux.

I-3-2-3 Suppléments antibiotiques

Afin de limiter les microorganismes interférents, le milieu de culture Middlebrook 7H11j peut être supplémenté en antibiotiques. En milieu hospitalier, pour la détection automatisée en milieux liquides, il est notamment utilisé le complexe d'antibiotiques 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.

I-3-2-4 Décontaminants chimiques

Les caractéristiques d'acido-alcoolo-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 & Aber, 1974 ; Thorel & 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 & Portaels, 1998**). Une méthode plus récente (SDS-NaOH à 3 %-1 % v/v) appelée Tacquet-Tison

(**Tacquet & Tison, 1961 ; 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 sur 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 cetylpyridium (cetylpyridininium 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 & Böttger, 2002**) et semble convenir à des échantillons très contaminés par des microorganismes interférents comme des fèces (**Yajko *et al.*, 1993**). La méthode au chlorure de cetylpiridium (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**).

Les étapes de concentration et de décontamination entraînent souvent la perte de Mycobactéries cultivables, et les milieux de culture sont toujours relativement sélectifs car iIs ne mettent pas en évidence certains organismes non cultivables (**Pickup *et al.*, 2005**). L'inconvénient majeur, les Mycobactéries sont généralement des bactéries à croissance lente dont la culture peut prendre une semaine à plusieurs mois. Néanmoins, les cultures restent nécessaires pour décrire les espèces et pour mieux comprendre leur physiologie et leur génétique, ainsi que pour tester leur sensibilité aux antibiotiques.

I-3-3 Détection et Quantification des Mycobactéries 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 MNT. 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.

I-3-4 Détection et Quantification des Mycobactéries 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 MNT a fait l'objet de beaucoup plus de développement d'outils analytiques en biologie moléculaire.

I-3-4-1 Amorces de la bibliographie

Les amorces de polymérisation en chaine (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), *hsp*65 (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 chaine et analyse par restriction enzymatique (polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis: PCR-REA), PCR classique ou PCR en temps réel.

Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de consensus sur les gènes et la position à cibler pour détecter spécifiquement les Mycobactéries. Par ailleurs, il est à noter une récente technologie nommé 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 MNT, ni fait l'objet de comparaison avec d'autres méthodes de quantification moléculaires.

I-3-4-2 Caractérisation des acides mycoliques

La caractérisation biochimique des nouvelles espèces de MNT 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 MNT 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-dichlométhane en phase mobile (**Butler et Kilburn, 1990 ; Ridderhof *et al.,* 1991 ; Butler *et al.,* 1992 ; Cage, 1992 ; Raffi *et al.,* 1992 ; Guthertz *et al.,* 1993 ; Thibert & Lapierre, 1993 ; Cage, 1994 ; Duffey *et al.,* 1996**).

les centres américains de maîtrise des maladies, 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**.). 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 MNT décrites, sans parler

des comparaisons interlaboratoires qui nécessiteraient des protocoles HPLC rigoureusement identiques.

I-3-4-3 Hybridation inverse ou non

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*). 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 ne permettent donc pas d'identifier l'ensemble des espèces de MNT 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 leInno-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**).

La souche type de *M. abscessus* a été décrite par Moore et Frerichs en 1953 à la suite d'un cas d'infection du genou avec des lésions d'abcès profonds sous-cutanés (**Moore & Frerichs, 1953**). D'autres isolats ont été dénommés *M. runyonii* avant d'être reconnus

synonymes de *M. abscessus. M. abscessus* a également été considérée pendant de nombreuses années comme une sous-espèce de *M. chelonae*, une Mycobactérie à croissance rapide infectant les amphibiens et les poissons et responsable d'infections cutanées chez l'homme jusqu'en 1967 (**Takeya, 1967**). Une étude publiée en 1972 a permis de séparer *M. chelonae* de *M. fortuitum* et a abouti à la définition de deux sous-espèces : *M. chelonae subsp. chelonae* et *M. chelonae subsp. abscessus* sur la base de critères d'identification phénotypiques (**Kubica, 1972**). Avec le développement des techniques d'hybridation ADN-ADN et des définitions strictes de spéciation (un taux d`hybridation ADN-ADN entre deux souches inférieur à 70% définit 2 espèces différentes), il a été possible d'élever *M. chelonae subsp. chelonae* et *M. chelonae subsp. abscessus* au rang d'espèce en 1992 (**Kusunoki & Ezaki, 1992**) sous le nom de *M. chelonae* et *M. abscessus*. Cependant, dès 1999, le séquençage du gène *hsp65* (**Ringuet, 1999**) a permis de mettre en évidence une hétérogénéité au sein de l'espèce *M. abscessus* du fait de la description de variants génomiques différant de 5 à 6 pb par rapport à la séquence *hsp65* de la souche type. Cette hétérogénéité a été confirmée par le séquençage du gène codant pour la sous-unité beta de l'ARN polymérase (*rpoB*) ; ce qui a conduit à proposer l'appellation complexe *abscessus* et la division de l'espèce *M. abscessus* sensu lato en trois espèces : *M. abscessus sensu stricto, M. massiliense* (**Adekambi, 2004b**) et *M. bolletii* (**Adekambi, 2006a**). Toutefois, des études phylogénétiques ont montré récemment que la différenciation des trois espèces n`est pas simple. Il y a eu un transfert horizontal de séquences ribosomales *rpoB* entre les 3 espèces, ne permettant pas de les différencier par un simple séquençage du gène *rpoB.* De plus, des approches de séquençage multilocus (*rpoB, hsp65, sodA*) ne permettent pas clairement de les distinguer (**Macheras, 2011**). En 2011, Leao *et al.* recommande la création de deux sous-espèces, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*, comprenant *M. massiliense* et *M. bolletii*, et *M. abscessus* subsp. *abscessus*, remplaçant *M. abscessus* sensu stricto (**Leao, 2011**). Cependant, d`autres études tendent à différencier ces espèces ou sous-espèces par leur phénotype et leur génotype de résistance aux antibiotiques. Par exemple, une sensibilité à la clarithromycine est observée chez *M. massiliense* tandis que les souches de *M. abscessussensu stricto* et *M. bolletii* possèdent un gène de résistance inductible, la clarithromycine, le gène *erm(41)* (**Bastian, 2011**). Tout comme les méthodes Inno-LiPA Mycobacterial v2 et GenoType CM/AS, la méthodeAccuProbe assays ne convient pas à l'identification des MNT environnementales en raison du fait qu'elles ont été développées pour des échantillons cliniques et que certaines erreurs d'identification ont déjà été observées.

I-3-4-4 Séquençage multi-locus

Après la première espèce de MNT décrite en 1889 (**Trevisan, 1889b**) : *M. smegmatis* qui a initialement été baptisé *Bacillus smegmatis* (**Lehmann & Neuman 1899a**), 48 espèces de MNT 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, à la faible sensibilité des méthodes de détection microscopiques par coloration de Ziehl-Neelsen, coloration à auramine-rhodamine, ou coloration de Kinyoun (**Woods & 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.

Tout comme pour l'ensemble du règne bactérien, le séquençage du gène *rrs* est la référence pour identifier les MNT, et bien qu'ajoutant un pouvoir de discrimination additionnel, les compléments d'analyse par le séquençage des gènes *gyrB*, *hsp*65, *recA*, *rpoB* ou *sodA*, restent peu décrits chez les Mycobactéries (**Adékambi & Drancourt, 2004a ; Gomila *et al.*, 2007**). Le séquençage des gènes *recA*, *hsp*65 ou *gyrB*, semble apporter un complément analytique au séquençage de *rrs*, en raison d'un pouvoir de discrimination additionnel (**Adékambi & Drancourt, 2004a ; Gomila *et al.*, 2007**). En particulier le gène très polymorphe *hsp*65 est souvent utilisé pour identifier des MNT 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**) 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 MNT par MLSA (**Adékambi & Drancourt, 2004a ; Gomila *et al.*, 2007**), car les séquençages de ces deux gènes semblent présenter des degrés de robustesse similaires (**Adékambi & Drancourt, 2004a**). 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 (**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

MNT 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 & Drancourt, 2004a ; Gomila *et al.,* 2007**).
Néanmoins, le séquençage de *rpoB* présente un intérêt pour apprécier la résistance des Mycobactéries à la rifampicine (**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, 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 MNT.

I-3-4-5 Séquençage du gène *rrs*

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. 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 & Drancourt, 2004a**) et8FPL/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. 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 différentiation 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 séquencent 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 pour différencier certaines MNT 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 de 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 MNT à croissance rapide (**Gomila *et al.,* 2007**).

D'après une autre étude, le séquençage de la quasi-totalité du gène de référence codant l'ARNr 16S, via le couple d'amorce fD1/rP2 (**Adékambi & Drancourt, 2004a**), 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 MNT à croissance rapide (**Adékambi & Drancourt, 2004a**). 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 & Drancourt, 2004a**). Tout comme ces espèces de MNT 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**).

I-3-4-6 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.*, 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.

Le séquençage partiel de *gyrB*, via les amorces GyrbA/GyrbE (321 pb), semble être plus discriminant que le séquençage de référence du gène *rrs*. Le polymorphisme plus important 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**).

I-3-4-7 Séquençage partiel du gène *hsp65*

Le gène *hsp*65, 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 GeneBank NC_008595), peut être utilisé pour identifier les Mycobactéries par séquençage via les amorces MAChspF_574/ MAChsp65R. 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 *hsp*65 (**Turenne *et al.* 2006**). La région 5' du gène *hsp*65, 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 MNT (**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**). 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 (**Adékambi & Drancourt, 2004a**). Cette région de *hsp*65 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 (**Randomski *et al.*, 2010**). Le séquençage de cette région du gène *hsp*65 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 & Drancourt, 2004a**).

Néanmoins, en raison des valeurs faibles de bootstraps d'embranchement du dendrogramme, le séquençage de *hsp*65 semble, dans cette étude, moins robuste que le séquençage du gène *rrs* pour identifier les MNT à croissance rapide (**Adékambi & Drancourt, 2004a**).

L'importance clinique de *MABSC* a conduit au séquençage du génome de *M. abscessus sensu stricto* par une équipe française en 2009 (**Ripoll *et al.*, 2009**). Depuis, plusieurs souches du complexe ont été séquencées (**Chan, 2012; Choi, 2012; Choo, 2012a; Choo, 2012b**). Les différentes souches possèdent un chromosome circulaire d`environ 5 000 000 pb. Cette taille est proche de la taille du génome de *M. tuberculosis* (4,4 Mb), et inférieure à celle du génome de *M. smegmatis* (6,9 Mb), une Mycobactérie à croissance rapide non pathogène dont l'organisation des gènes est très similaire . Celle de *M. abscessus*. La teneur moyenne en GC du génome de *MABSC* est de 64 % et le nombre de séquences codantes varie de 4706 à 4923 selon les souches séquencées (**Chan, 2012 ; Choi, 2012 ; Choo, 2012a ; b**). Contrairement aux autres génomes mycobactériens séquencés, le génome de *M. abscessus* est pauvre en séquence d'insertion, mais contient un prophage (81kb) dont la biologie est actuellement inconnue. La souche héberge également un plasmide contenant des gènes de résistance au mercure présentant 99,9% d'homologie avec le plasmide de *M. marinum*. Ceci suggère le transfert de ce plasmide entre ces deux espèces susceptibles de partager le même écosystème (**Ripoll, 2009**). *M. abscessus* possède également des gènes non mycobactériens qui codent pour des facteurs de virulence présents également chez d`autres pathogènes très fréquemment isolés chez les patients atteints de mucoviscidose : *P. aeruginosa* et *B. cepacia*. Ces gènes sont vraisemblablement acquis de bactéries environnementales par transfert horizontal (**Medjahed, 2010**). Malgré sa croissance rapide, *M. abscessus* a un certain nombre de caractéristiques proches de *M. tuberculosis*. C`est un agent pathogène intracellulaire et contrairement à d`autres Mycobactéries à croissance rapide ayant deux opérons d`ARN ribosomal, *M. abscessus* n`en possède qu`un seul (**Ripoll, 2009**).

I-3-4-8 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 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 (**Adékambi & Drancourt, 2004a)**. 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*. 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 *hsp*65, 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*. 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 & Drancourt, 2004a**).

I-3-4-9 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' 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 (**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, 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 (**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/Fort4260R (**Kim *et al.*, 1999 ; Adékambi & Drancourt, 2004a**). Le séquençage total de *rpoB* a été proposé comme un complément d'analyse à l'identification des Mycobactéries par séquençage du gène *rrs* (**Adékambi & Drancourt, 2004a**). Dans cette étude, le séquençage de la totalité de *rpoB* semble tout aussi discriminant et robuste que le séquençage total du gène *rrs*.

I-3-4-10 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, a été proposé initialement (**Bull *et al.*, 1995**) pour identifier par séquençage les MNT 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 & Drancourt, 2004a**).

Plus récemment dans un objectif d'identification des MNT 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 & 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 MNT 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**).

I-3-4-11 Analyse phylogénique

L'identification des Mycobactéries par MLSA requière une analyse phylogénique pour comparer les séquences 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 (bioinformaticbacteriaidentification:BIBI) **(**http://umr5558-sudstr1.univlyon1.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 & Nei, 1987**) avec 1000 itérations de calcul pour le branchement des arbres phylogénétiques. Dans le cas des Mycobactéries, et en regard de la littérature (**Domenech *et al.*, 1997 ; Swanson *et al.*, 1997 ; Ringuet *et al.*, 1999 ; Turenne *et al.*, 2006 ; Adékambi *et al.*, 2006b ; McNabb *et al.*, 2004 ; Gomila *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*,**), 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 & Cantor, 1969**).

II. MATERIEL ET METHODES

II-1 MATÉRIEL

II-1-1 Zones d'étude

Les différents échantillons utilisés dans cette étude ont été prélevés sur différents sites. Les zones ont été sélectionnées en fonction du nombre de cas notifiés d'Ulcère de Buruli selon le Programme national de l'Ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Il s'agit de : Adiopodoumé, Tiassalé, Adzopé, Agboville, Bouaké, Aghien (**Figure 7**).

II-1-2 Choix des stations d'échantillonnage

Le choix s'est porté sur les plans d'eau utilisés par les populations riveraines pour leur différentes activités. A Aghien, les points d'échantillonnage ont été repartis sur toute l'étendue du plan d'eau. Pour les sites d'Adzopé, Tiassalé, Agboville, Adiopodoumé et Bouaké, les points les plus faciles d`accès et où l'écoulement était le plus lent possible ont été choisis. Il a été sélectionné 11 stations pour la Lagune Aghien, 3 stations sur la Retenue d'Adzopé, 1 station sur le site d'Agboville, 3 stations sur le site de Tiassalé dont 1 station sur le site de Sokrogbo 1, 1 station sur le site de Sokrogbo 2, 1 station sur le site de Bodo, 2 stations sur le site d`Adiopodoumé, 1 station sur la retenue de Loka à Bouaké.

II-1-2-1 Adzopé

La ville d'Adzopé est localisée dans le sud-est de la Côte d'Ivoire qui appartient à la zone subéquatoriale (**Iltis & Lévêque, 1982**). La ville d'Adzopé est classée parmi les zones d'hyperendémicité des ulcérations cutanées. Aussi avons-nous échantillonné aux alentours de la retenue d'eau située dans la ville. Cette retenue d'eau, est située entre 6°10'52'' et 6°12'15'' de latitude nord et entre 3°85'65'' et 3°86'73'' de longitude ouest (**Adon *et al.*, 2013**). Située dans le bassin versant du Fleuve Mé de 20.46 Km^2, la retenue d'eau a été construite en 1977 par l'état sur la rivière Mansan pour répondre aux besoins de plus en plus croissants de la population en eau potable. C'est un lac de près de 2 km de longueur qui occupe une superficie de 61,44 ha avec une profondeur maximale de 7 m. Elle sert à la production d'eau potable pour les villes d'Adzopé, Zodji et Miadzin. Elle est caractérisée par 4 saisons : grande saison des

pluies (Avril-Juillet) ; petite saison sèche (Aout-Septembre) ; petite saison des pluies (Octobre-Novembre) ; grande saison sèche (Décembre-Mars).

II-1-2-2 Agboville

Construit sur le fleuve Agnéby avec un bassin versant de 4600 Km^2, il a comme coordonnée 365454X (4°12'54,39''N) et 656659Y (5°56'37,20''O). Il a une capacité maximale de $0,665.10^6$ m^3. Il sert à la production d'eau potable pour les villes d'Agboville, Banguié 1, Ery Makouguié 1, Ery Makouguié 2, Grand Moutcho, Laoguié. La rivière Agnéby est un cours d'eau côtier de direction nord-sud qui prend l'une des sources dans les environs des villages d'Afféry dans le département de Bongouanou à l'altitude 205 m. Ce cours d'eau s'écoule entièrement en territoire ivoirien. Son bassin versant couvre une superficie d'environ 8500 km² et développe son lit sur environ 217 km. Ses affluents sont le M'pébo, le Kavi et le Séguié. La pente du bassin est assez régulière et relativement faible, soit 1,25m/km. Elle a une profondeur de 4,91 m et occupe une superficie estimée à 61.44 hectares sur une longueur de 2 km. Une grande partie du bassin se trouve en dessous de 100 m avec une altitude moyenne de 105 m. Le bassin versant de l'Agnéby fait partie du sud forestier ivoirien. Il est composé de quatre formations végétales. Il s'agit des forêts marécageuses à *Symphonia globulifera* (Guittifères) et *Mitragyna ciliata* (Rubiacées), de la forêt dense sempervirente à *Diospyros spp*. (Ebénacées) et *Mapania spp*. (Cypéracées) sur un sol à forte capacité de rétention en eau. Cette dernière renferme les espèces les plus hygrophiles du secteur ombrophile. Les deux autres formations sont la mangrove sur un sol hydromorphe à gley et la forêt dense sempervirente de sol ferme. Le climat est de type équatorial de transition avec une pluviométrie supérieure à 1500 mm/an. Il est caractérisé par deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches. L'agriculture est la principale activité du bassin. Elle représente en moyenne plus de 80 % de l'ensemble des activités menées **(Goula *et al.*, 2009)**.

II-1-2-3 Lagune Aghien

La lagune Aghien est située dans le bassin versant du fleuve Comoé entre 5°20 et 5°30 latitude Nord et 3°50 et 3°55 longitude Ouest. Elle est située à environ 5 km au Nord de Bingerville, et renferme une partie de la ville d'Abidjan, et d'Anyama. Cette lagune est assez éloignée de la lagune Ebrié (**N'gohesse, 2007**). Elle forme avec la lagune Potou un système occupant la même dépression qui a été scindée en deux par les apports de la Mé (**Humbert, 2012**). Cette position lui donne la possibilité de rester pratiquement isolée des apports d'eau des autres

lagunes pendant les marées. Elle garde par conséquent, une salinité très faible maintenue par les apports d'eau douce des rivières Djibi, Bété et Mé. Les lagunes Aghien, Potou et Ebrié forment le plus grand système lagunaire de la Côte d'Ivoire et de l'Afrique de l'Ouest. Elle couvre une superficie de 361 Km² et un périmètre de 92,8 km pour un indice de compacité Kc=1,37 (forme allongée). La lagune Aghien a une superficie de 20 km² pour un périmètre de 40,72 km et un volume estimé à 25km^3. Elle fait partie du réseau lagunaire d'Abidjan. Elle est alimentée par deux affluents principaux que sont la Djibi et le Bété. La carte des directions d'écoulement indique que l'écoulement sur le bassin versant de la lagune Aghien se fait préférentiellement dans le sens 315° soit dans la direction Nord-ouest et Sud-est. Le bassin d'influence de la lagune Aghien est drainé par deux rivières (Djibi et Bété) qui prennent leur source dans des zones agricoles et urbaines. Ces eaux de ruissellement sont généralement les moteurs de propagation des polluants organiques et chimiques (**N'go *et al.,* 2004; Goné, 2009 et N'Guessan *et al.,* 2014**). Les eaux de ruissellement contiennent plusieurs types de polluants d'origines domestiques, industrielles, agricoles, urbaines, etc. Le déversement de ces polluants dans les eaux de surface constitue le point de départ de la pollution des eaux (**N'Guessan *et al.,* 2011**). La présence de village en bordure de la lagune, à l'intérieur du périmètre de protection immédiat, augmente la difficulté de mettre en œuvre ce périmètre. Ces villages communiquent directement avec la lagune et y déversent les déchets (**figure 4**).

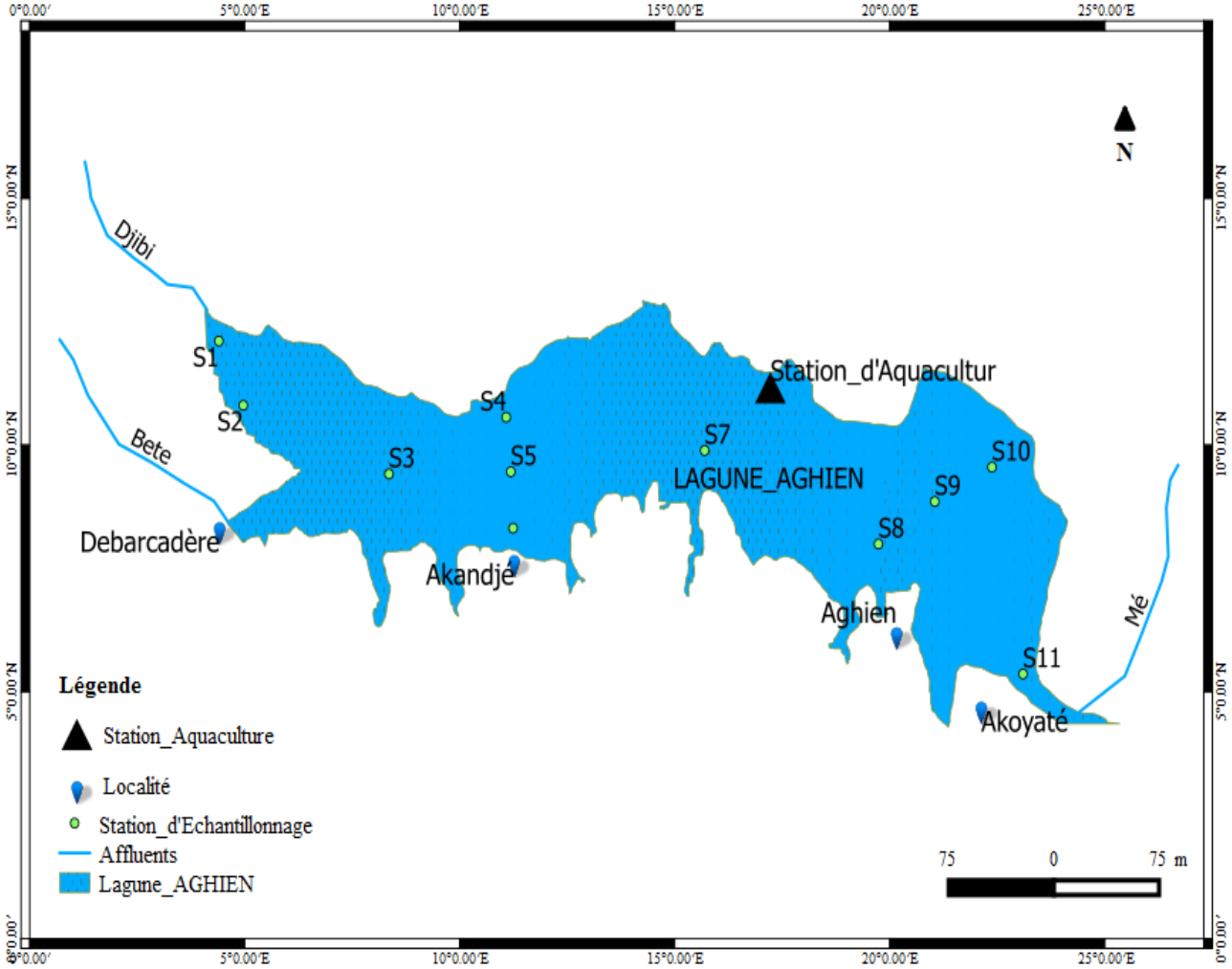


Figure 4 : Réseau lagunaire dans la région d'Abidjan (Guiral & Ferhi, 1989)

II-1-2-4 Site de Tiassalé

Tiassalé est situé à 126 km d'Abidjan, entre 058 53' de latitude nord et 048 49' de longitude ouest. Tiassalé se situe dans le bassin du fleuve Bandama, recouvre des zones différentes sur le plan climatique et biogéographique (**Lévêque *et al.*, 1983**). Long de 1050 km, le Bandama prend sa source dans le nord du pays, entre Korhogo et Boundiali, à une altitude de 480 m (**Lévêque *et al.*, 1983)**. L'Ulcère de Buruli est hyper endémique à Tiassalé selon le Programme National de Lutte contre l`Ulcère de Buruli en Côte d`Ivoire (PNLUB-CI). De 2004 à 2007, 675 cas y ont été notifiés selon le PNLUB. Les sites d'étude choisis à Tiassalé étaient deux différentes marres situées dans les villages de Sokrogbo et de Bodo. Ces sites ont été choisis sur la base de la présence dans ceux-ci d'au moins un cas notifié d'Ulcère de Buruli (**Figure 5).**

II-1-2-5 Site d'Adiopodoumé

Adiopodoumé est situé à 17 km d'Abidjan. Situé aux abords de la lagune Ebrié, le village d'Adiopodoumé est traversé par une rivière et au sud par la lagune Ebrié. Sa situation en bordure du littoral lui confère un climat équatorial humide avec une hygrométrie de 90 à 100%. Le site se trouve dans un bassin sédimentaire et les sols sont de type sédiments argileux. Les activités y sont diversifiées, on y rencontre des pêcheurs et des cultivateurs (**KOFFI, 2007**). Ce site a été choisi sur la base de la présence d'au moins un cas notifié d'Ulcère de Buruli. Les échantillons ont été prélevés aux alentours de la rivière dont les coordonnées géographiques sont 05°20.349' de longitude Ouest et 004°07.442' de latitude Nord.

II-1-2-6 Site de Loka

La Loka est un des principaux cours d'eau du réseau hydrographique du Kan, affluent de rive droite du Bandama Blanc. Elle naît dans le horst granitique au nord-ouest de Bouaké, à environ 400 m d'altitude. Après un cours de 17 km, son bassin versant est de 135 km^2. Il est coupé par un barrage (à 20 km à l'ouest de Bouaké) aménagé par la Société de Distribution d'Eau de la Côte d'Ivoire (SODECI) pour l'alimentation en eau de la ville de Bouaké. Le climat de la région est du type équatorial de transition atténué, avec une pluviométrie moyenne annuelle de 12"00 mm. Le sol y est ferralitique, sur un socle granitique. C'est le domaine de la savane guinéenne préforestière arbustive **(Sighomnou, 1983) (Figure 6).**

Les données GPS des différents points de prélèvement sont décrites en annexes.

Figure 5 : Marre de SOKROGBO (TIASSALE) (photo : Vakou, 2016).

Figure 6 : Site de LOKA (BOUAKÉ) (photo : Vakou, 2016).

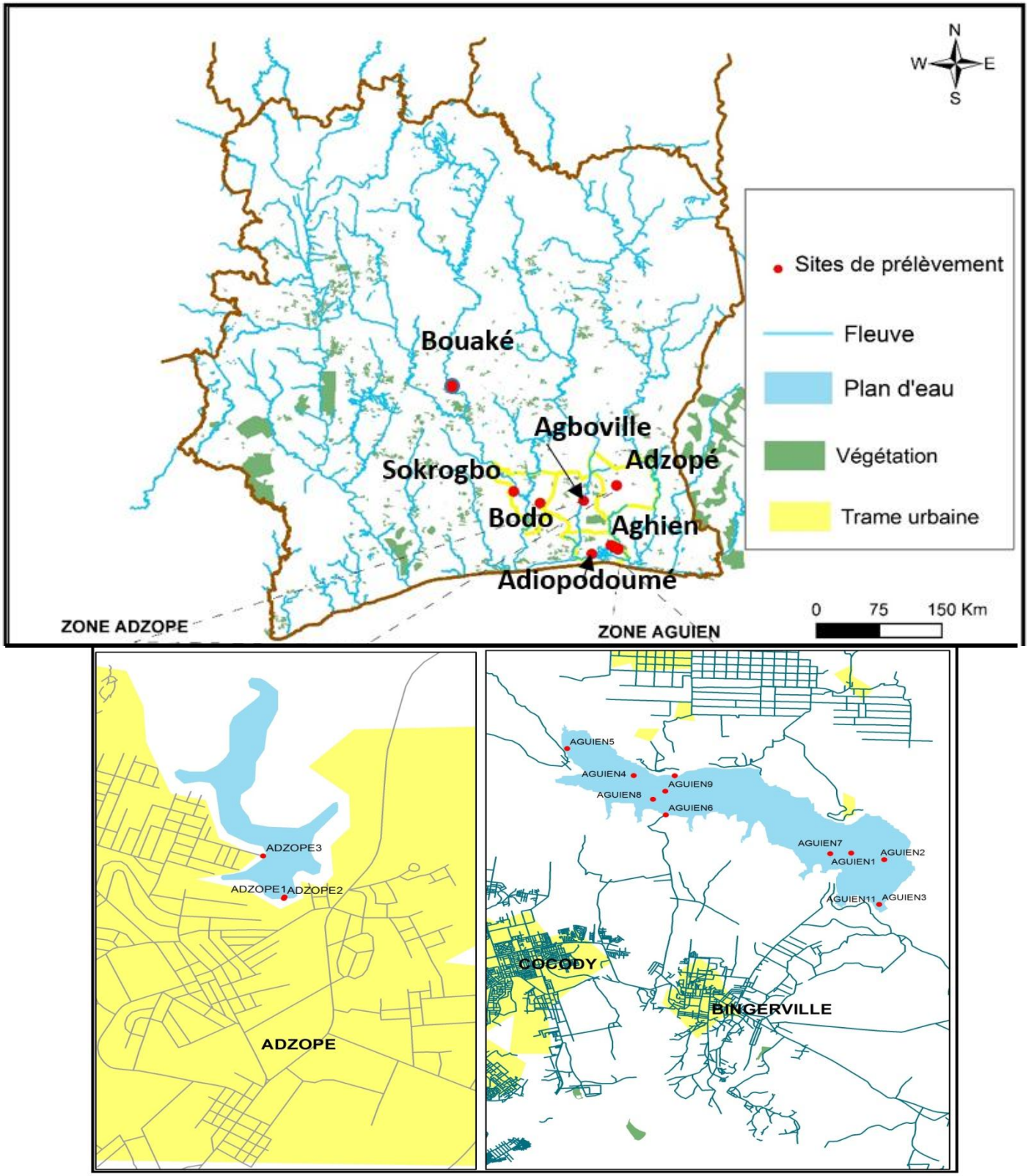


Figure 7 : Sites d'étude (Vakou *et al.*, 2016)

II-1-3 Type d'étude

Il s'agit d`une étude expérimentale utilisant des techniques de bactériologie classique et des tests biochimiques pour l'identification des isolats. Les tests de biologie moléculaire ont été utilisés pour le typage moléculaire des souches. Le dosage des nutriments dans l'eau a été éffectué par photométrie, la spectrophotométrie et la colorimétrie ont été utilisées pour le dosage des nutriments dans les sédiments.

II-1-4 Cadre de l'étude

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire aussi bien sur le site de Cocody qu'à Adiopodoumé.

- La préparation des milieux utilisés a été réalisée au niveau de deux unités, à savoir : l'Unité de Production des intrants de Laboratoire et l`Unité de Mycobactéries Tuberculeuses et Atypiques.
- L'expérimentation de la mise en culture des Mycobactéries ainsi que leur culture ont été réalisé dans le laboratoire des Mycobactéries environnementales de l`Institut Pasteur.
- L`extraction de l'ADN des souches de Mycobactéries obtenues et leur amplification ont été réalisées à la Plateforme de Biologie Moléculaire.
- Les analyses statistiques ont été réalisées à l'Unité d'Epidémiologie

II-1-5 Matériel d'échantillonnage

Le matériel biologique est constitué d'échantillons d'eaux et de sédiments prélevés sur les différents sites des zones étudiées.

II-1-5-1 Paramètres physico-chimiques

Pour l'échantillonnage, un seau à bec et une bouteille hydrologique de cinq litres de capacités ont été utilisés pour les prélèvements d'eau, une benne Ekman et un carottier ont été nécessaire pour le prélèvement des sédiments. Des sacs en plastique Zip lock ont été utilisés pour le conditionnement des sédiments prélevés. Des flacons stériles en verre borosilicaté d'un litre avec des bouchons en téflon ont été utilisés pour le conditionnement des échantillons d'eaux. Une barque a permis de circuler sur les plans d'eaux. Une glacière contenant des ice-pack a permis à la conservation de l'échantillon jusqu'à son acheminement au laboratoire (**Figure 8**).

Figure 8 : Matériel d'échantillonnage: (A= benne à sédiment EKMAN; B=Bouteille hydrologique) (Photo : COULIBALY Kalpy)

II-1-5-2 Culture des Mycobactéries

Un seau à bec et une bouteille hydrologique de cinq litres de capacité ont été utilisé pour les prélèvements d'eau, une benne Ekman et un carottier pour prélever les sédiments. Des Tubes de collecte de type Falcon 50 ml stériles ont été utilisés pour le conditionnement des échantillons d'eaux et de sédiments réservés à la culture. Une glaciere contenant des ice-pack a permis à la conservation de l'échantillon jusqu'à son acheminement au laboratoire.

II-1-6 Matériel d'analyse

II-1-6-1 Paramètres physico-chimique de l'eau et des sédiments

Divers équipements ont été utilisés pour la mesure des paramètres physiques et chimiques de l'eau et des sédiments. La mesure des valeurs de pH s'est faite à l`aide d`un pH-mètre portatif de marque Wagtech®. La mesure de la conductivité, la température et de la turbidité de l'eau a nécessité l'emploi d'un conductimètre portatif de marque Wagtech WTD® et d'un turbidimètre portatif de marque Wagtech WTD®. Le dosage des sels nutritifs dans l'eau (nitrate, nitrite, phosphate, phosphore, fer, etc…) a été effectuée à partir d'un photomètre (7100 Wagtech WTD®). L'analyse des sels nutritifs dans les sédiments (nitrate, nitrite, phosphate, phosphore, fer, etc…) a été effectuée à partir d'un spectrophotomètre de marque (HACH LANGE DR 2800®), Un GPS (Global Positioning System) de marque (MLR SP 12X®) a servi à obtenir les coordonnées géographiques des différents sites d'échantillonnage.
Un tube en verre a servi à recueillir le surnageant obtenu à partir des sédiments pour l'analyse chimique, une capsule de platine pour sécher le sédiment, une étuve a été utilisé pour le séchage des sédiments, un bécher de 100 à 150 mL couvert d'un verre de montre a permis de récupérer le résidu séché et une fiole jaugée de 100 mL a permi de recueillir le filtrat obtenu à partir du résidu additionné d'acide chlorhydrique sur papier filtre.

Réactifs pour le traitement des sédiments

La solution de nitrate d'ammonium, l'eau déionisée, l'acide chlorhydrique concentré chaud, l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique ont servi au prétraitement des sédiments avant de réaliser l'analyse chimique. Différents réactifs ont été utilisés pour l'analyse des éléments minéraux dans l'eau et les sédiments, ce sont :

- ***Dosage du fer***

La diméthylglyoxine ; le dithionite de sodium et l'ammoniaque concentrée ont servi à doser la quantité de fer contenu dans les échantillons.

- ***Dosage du Phosphore total***

Une solution d'acide sulfurique, une solution de molybdate d'ammonium, une solution d'acide ascorbique, une solution de tartrate double d'antimoine et de potassium, une solution mère étalon de phosphore, une solution fille étalon de phosphore ont servi à doser la quantité de phosphore total contenu dans les échantillons.

- ***Réactifs pour la minéralisation de l'échantillon***

L'acide sulfurique et le persulfate de sodium et un réactif combiné (solution d'acide sulfurique ; solution de tartrate double d'antimoine et de potassium ; solution de molybdate d'ammonium ; eau déionisée et d'acide ascorbique) ont servi à la minéralisation de l'échantillon en vue du dosage spectrophotométrique des orthophosphates contenus dans l'échantillon.

- ***Dosage du Chlorure***

Une solution titrante de Nitrate mercurique contenant du nitrate mercurique, de l'eau distillée et l'acide nitrique concentré ont servi au dosage colorimétrique du chlorure dans l'échantillon.

- ***Dosage du Sulfate $S0_4^{2-}$***

Le chlorure de Baryum ($BaCl_2$, $2H_20$), le réactif de sulfate $S0_4^{2-}$ constitué d'eau, de chlorure de sodium, de HCl concentré, de glycérol, et d'alcool et un erlenmeyer ont servi au mélange du réactif.

- ***Dosage du Nitrate***

Le salicylate de sodium, l'acide sulfurique concentré, le tartrate de sodium, l'eau distillée ont servi au dosage du Nitrate dans l'échantillon.

- ***Dosage du Nitrite***

Le réactif constitué de solution d'acide de sulfanilamide et de solution de N-(1-naphthyl)-éthylène diamine ont servi au dosage du Nitrite dans l'échantillon.

- ***Dosage du Calcium***

Le Calcon constitué d'acide calcone carboxylique ($C_{21}H_{14}N_{2O}7S$, $3H_2O$) et de chlorure de sodium ; d'hydroxyde de sodium constitué d'hydroxyde de sodium de l'eau et une pincée de l'indicateur acide calcone carboxylique. Une solution d'EDTA constituée de sel disodique, et

de l'acide éthylènediaminetétraacétique (C10H14N2O8Na2, $2H_2O$) ont servi au dosage du calcium dans l'échantillon.

II-1-6-2 Culture des Mycobactéries

➢ II-1-6-2-1 Réactifs de décontamination

Le chlorure de Cétylpyridinium monohydraté (Sigma®) a servi pour la décontamination des échantillons d`eaux et de sédiments (**Stinear *et al.*, 2004**).

➢ II-1-6-2-2 Réactifs de coloration de Ziehl-Neelsen

L`acide chlorhydrique concentré, l`éthanol 95°C, la fuchsine basique, le phénol et le bleu de méthylène ont servi à la coloration de Ziehl-Neelsen pour la recherche des bacilles acido alcoolo résistants (BAAR).

➢

➢ II-1-6-2-3 Réactifs de coloration de Gram

Le violet de gentiane, le lugol, l`éthanol 95°C, l'acétone, la fuchsine basique ont servi à la coloration de Gram afin de différencier les bactéries Gram négatifs des bactéries Gram positifs.

➢ II-1-6-2-4 Milieux de culture

Il s'agit des milieux Löwenstein-Jensen (Sigma-Aldrich Co. LLC®, USA), Gélose ordinaire (BIO-RAD® France) ; Middlebrook 7H10 (BD DIFCO ® USA) ; Citrate de Simmons (BIO-RAD® France) ; Mannitol (BIO-RAD® France).

➢ ***Milieu de Löwenstein-Jensen***

A base de sels minéraux, asparagine, glycérine, jaunes d'œufs, vert malachite, c'est le milieu de référence. Il a servi à l'isolement primaire des Mycobactéries à partir des échantillons d`eaux et de sédiments. La préparation du milieu est décrite en annexe.

- ***Milieu gélosés***

Les milieux Gélose ordinaire ; Middlebrook 7H10 ont servi au repiquage afin d`obtenir des colonies isolées à partir desquelles seront réalisés les différents tests biochimiques.

-
- **II-1-6-2-5 Identification des Mycobactéries**

Gélose ordinaire (Trypto-Caséine Soja), un milieu de Löwenstein-Jensen contenant 5% de NaCl et un milieu de Löwenstein-Jensen sans NaCl (témoin), milieu citrate de simmons, milieu mannitol, eau oxygénée à 30 volumes, milieu Middlebrook 7H10, ont servi pour la confirmation des Mycobactéries atypiques. Une pipette pasteur montée d'une poire a servi à distribuer des gouttes de la suspension au fond du tube contenant le milieu. Une anse de platine préalablement stérilisée pour effectuer un isolement en stries , une étuve, un agitateur magnétique chauffant et un barreau aimanté pour dissoudre le milieu des tubes à vis (90 x 130 mm) pour répartir les différents milieux , une autoclave pour stériliser le milieu.

- **II-1-6-2-6 Autres matériels**

Des pipettes graduées de 10 mL ont été utilisés dans la décontamination des échantillons en vue de l'ensemencement dans les tubes à vis.

Un réfrigérateur (XPER®) a été utilisé pour la conservation des milieux de culture, une étuve (Memmert®) de 32°C et de 37°C ont servi à la conservation de Mycobactéries ensemencées sur les différents milieux.

Un papier aluminium a été utilisé pour le test de photo-induction des Mycobactéries, une balance de précision (Sartorius®) a permis de peser les quantités précises de produits chimiques déshydratés pour la reconstitution des milieux pour les Mycobactéries.

Un microscope optique (Zeiss®) a été utilisé pour l`observation des bacilles acido-alcolo résistants après la coloration de Ziehl-Neelsen, également pour la coloration de Gram (**Barksdale & Kim, 1977**).

II-1-6-2-7 Analyses moléculaires

Le phénol et le chloroforme ont été utilisés comme composés chimiques pour l'extraction de l'ADN, des cryotubes de 1,5 mL, 2mL (Eppendorf®) ont permis de recueillir les différentes suspensions. Une centrifugeuse (HETTICH®) a permis de séparer les différentes

phases d'ADN pendant l'extraction. Un incubateur thermocycleur (Applied Biosystems®) a été utilisé pour chauffer l'ADN à 60°C pendant 1 heure. Un vortex (VWR Galaxy ministar ®) a permis d'homogénéiser le mélange.

Des micropipettes type P1000, P100, P200, P10 (Eppendorf®) ont été utilisée pour la répartition des différents aliquots. Un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) de type 2 (Hotte), stéril guard III (Baker®) a été utilisé pour protéger aussi bien le manipulateur que l'échantillon de toute contamination. Des Micropipettes P1000, P200, P20 (Eppendorf®) ont servi à distribuer les différentes gammes de volume des réactifs et échantillons. Un congélateur (-20°C) et un réfrigérateur (+4°C) de marque HISENSE® ont permis de conserver les produits de l'extraction et des réactifs. Un thermomixer compact «Eppendorf ®» a été utilisé lors de la PCR. Une Mini centrifugeuse de marque HETTICH® a permis d'homogénéiser le mélange.

Un thermocycleur "GENE AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems®) a été utilisé pour l'amplification classique des gènes.

Un appareil STEP ONE PLUS® pour la PCR en temps réel a été utilisé pour l`amplification des gènes IS2404 (séquence d`insertion de *Mycobacterium ulcerans,* responsable de l`Ulcère de Buruli (UB) et KR (enzyme de la toxine, la Mycolactone responsable des ulcérations dans le cas de l`UB).

- **Les amorces utilisées et programme d'amplification**

Différentes amorces ont été utilisées pour amplifier les gènes IS6110 codant pour l'ARNr 16S ou 16S RNA (caractéristique d'une grande majorité de Mycobactéries), IS2404 (séquence d`insertion retrouvée chez *Mycobacterium ulcerans,* responsable de l`Ulcère de Buruli (UB)), KR (enzyme de la toxine appelée mycolactone responsable des ulcérations dans le cas de l`UB) et MIRU VNTR (utilisé dans le typage moléculaire des souches de Mycobactéries) (**Tableau I**). Le programme d'amplification utilisé est spécifique de chaque gène (**Tableau II**).

- **Migration et visualisation des produits d'amplification**

Une cuve à électrophorèse a été utilisée pour la séparation des fragments amplifiés. La préparation du gel d'agarose a nécessité une balance de précision « ADAM AQT 600 ®» pour peser les quantités précises de poudre d'agarose (BIORAD®). Un four à micro-onde (COOKWORKS®) a servi au chauffage de la solution d'agarose (poudre d'agarose dans du TBE (Tris Borate EDTA) 1X (Sigma®)). La détection des produits d'amplification a été faite par le système Gel Doc E2 Imager « BIO-RAD Laboratories® » (U.S.A

Tableau I : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes

Gènes	Amorces	Séquences (5'-3')	Cible	Références
IS6110	MYCGEN-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Gène commun à une majorité de Mycobactéries	**Wilton & Cousin, (1992)**
	MYCGEN-R	TGCACACAGGCCACAAGGGA		
IS2404	IS2404 F	ATTGGTGCCGATCGAGTTG	Séquence d`insertion retrouvée chez *Mycobacterium ulcerans* et d'autres Mycobactéries de l'environnement	**Ross et *al.*, 1997**
	IS2404 Ré	TCGCTTTGGCGCGTAAA		
	IS2404-probe	6 FAM-CACCACGCAGCATTCTTGCCGT-TAMRA		
KR	KR F	TCACGGCCTGCGATATCA	Enzyme de la toxine appelée Mycolactone	**Fyfe et *al.*, 2007**
	KR R	TTGTGTGGGCACTGAATTGAC		
	KR-probe	6 FAM-ACCCCGAAGCACTG-TAMRA		
MIRU1	MIRU1 F	GCTGGTTCATGCGTGGAAG	Typage moléculaire des souches de Mycobactéries basé sur le nombre de répétitions au niveau des différents loci	**Stragier et *al.*, 2005 ; Ablordey et *al.*, 2005 ; Hilty et *al.*, 2006**
	MIRU1 R	GCCCTCGGGAATGTGGTT		
ST1	ST1 F	CTGAGGGGATTTCACGACCAG		
	ST1 R	CGCCACCCGCGGACACAGTCG		
VNTR-19	Locus 19F	CCGACGGATGAATCTGTAGGT		
	Locus 19R	TGGCGACGATCGAGTCTC		
VNTR-6	Locus 6 F	GACCGTCATGTCGTTCGATCCTAGT		
	Locus 6 R	GACATCGAAGAGGTGTGCCGTCT		

Tableau II : Programme d'amplification des gènes

Gènes	Programme d'amplification	Cible	Références
IS6110	94°C, 5 min 94°C, 30 s 62°C , 45 s 72°C, 1 min 30 } x 40 72°C, 10 min	Gène commun à une majorité de Mycobactéries	**Wilton & Cousin, (1992)**
IS2404	50°C, 2 min 95°C, 10 min 95°C, 15 S 60°C, 1 min } x 35	Séquence d`insertion retrouvée chez *Mycobacterium ulcerans* et d'autres Mycobactéries de l'environnement	**Ross et *al.*, 1997**
KR	50°C, 2 min 95°C, 10 min 95°C, 15 S 60°C, 1 min } x 35	Enzyme de la toxine appelée Mycolactone	**Fyfe et *al.*, 2007**
MIRU1	95°C, 2 min 94°C, 1 min 58°C ,1 min 72°C, 1 min } x 35 72°C, 10 min	Typage moléculaire des souches de Mycobactéries basé sur le nombre de répétitions au niveau des différents loci	**Stragier et *al.*, 2005 ; Ablordey et *al.*, 2005 ; Hilty et *al.*, 2006**
VNTR-6			
VNTR-19			
ST1	95°C, 2 min 94°C, 30sec 65°C, 30 sec 72°C, 1min } x 35 72°C, 10min		

II-2 Méthodes

II-2-1 Méthode d'échantillonnage

Les prélèvements mensuels ont été réalisés de Juin 2014 à Novembre 2015**.** Les échantillons ont été prélevés dans différents contenants et conservés en fonction du type d'analyse à effectuer.

- **Prélèvement/Echantillon d'eau**

Les échantillons d'eaux ont été prélevés en surface. En bordure des plans d'eau, un seau à bec de capacité cinq Litres a été plongé dans l'eau pour réaliser le prélèvement. Ensuite, l'échantillon est conditionné dans des flacons stériles en verre borosilicaté d'un litre préalablement rincés avec l'eau à analyser. Pour les prélèvements d'eau à distance des berges, une bouteille hydrologique de 1,5 litre de capacité a été plongée dans l'eau. La bouteille a été stabilisée à environ 0,5 m de profondeur pour l'échantillonnage. Les échantillons ainsi prélevés ont été conditionnés comme précédemment décrit. Pour l'analyse chimique, les flacons ont été remplis jusqu'à rabord. Le bouchon est placé de telle sorte qu'il n'y ait aucune bulle d'air dans le récipient et qu'il ne puisse être éjecté au cours du transport (**Norme 2006 ; Britton & Gresson, 1987**). Pour la culture des Mycobactéries, une quantité d`eau de 500 mL a été prélevée et conditionnée dans des flacons du même type.

- **Prélèvement/Echantillons de sédiments**

Une benne Ekman a été utilisée pour prélever les sédiments au niveau des stations en grande eau (à distance des berges). La benne attachée à une solide corde est plongé jusqu'au fond du plan d'eau afin de recueillir le sédiment et est ensuite relevée. L'échantillon est conditionné dans des sacs en plastique de type Zip lock®. En bordure des berges, un carottier a servi au prélèvement des sédiments à 5 cm environ de profondeur (**Schiavone & Coquery, 2011**). Les échantillons ainsi prélevés sont conditionnés comme décrit ci-dessus. Tous les échantillons prélevés ont été marqués avec un marqueur indélébile (site de prélèvement, date, numéro de l'échantillon, type d'échantillon).

- **Traitement et transport de l'échantillon**

Les échantillons prélevés sont conservés dans une glacière contenant des accumulateurs de froid afin de les maintenir à une température de l'ordre de +4°C jusqu'à l'arrivée au laboratoire, à l'abri de la lumière dans les 24 heures suivant l'échantillonnage (**Norme ISO 5667-15, 2009**). Le transfert au laboratoire s'est fait le jour du prélèvement.

Pour l'analyse des données bactériologiques et physico-chimiques, les études ont débutés le même jour du prélèvement ou conservés au réfrigérateur à +4°C pour débuter les travaux le lendemain au plus tard.

II-2-2 Paramètres Physico-chimique

II-2-2-1 Eau

L'analyse physique des échantillons d'eau (température, conductivité, turbidité et pH) a été effectuée *in situ* entre 9 et 10 h du matin. Le pH-mètre portatif de marque Wagtech® est plongé dans l'eau. Ensuite, la mesure du pH qui apparait sur l'écran de l'appareil est relevée. La mesure de la conductivité, la température et la turbidité de l'eau a nécessité l'emploi d'un conductimètre portatif de marque Wagtech WTD® et d'un turbidimètre portatif de marque Wagtech WTD®. La température de l'eau est affichée en degrés Celsius (°C), la conductivité en milliSiemens par centimètre (mS/cm), et la turbidité en Unité de Turbidité Néphélométrique (NTU).

L`analyse chimique a été réalisée par photométrie (7100 Wagtech WTD®) à l`aide de pastilles adaptées à chaque élément minéral recherché à savoir, le nitrate, le nitrite, le phosphore, le phosphate, le fer total. Les pastilles réactives correspondant à chaque paramètre ont été utilisées en suivant la procédure donnée par le fabricant.

II-2-2-2 Sédiments

Pour les paramètres physiques mesurés in situ (pH, température, conductivité, turbidité) une petite quantité (5 g) de sédiment a été mélangé dans 5 mL d'eau distillée stérile, le surnageant est ensuite récupéré dans un tube en verre et analysé comme précédemment décrit. Les paramètres chimiques ont été réalisés par spectrophotométrie (HACH LANGE DR 2800®). Pour l'analyse des paramètres chimiques, les sédiments ont été traités comme suit :

Un à 2 g de sédiment est introduit dans une capsule de platine, une solution de nitrate d'ammonium est ajoutée à raison de 2 mL par gramme de sédiment. Le mélange est ensuite séché dans une étuve à 110 °C. La capsule est placée dans le four froid et chauffée progressivement pour atteindre 450 °C pendant 2 heures. La capsule est ensuite retirée du four et refroidie.

Le résidu est transféré dans un bécher de 100 à 150 mL en le reprenant dans quelques mL d'eau déionisée. La capsule est rincée deux fois avec 5 mL d'acide chlorhydrique concentré chaud, puis deux fois avec environ 5 mL d'eau déionisée bouillante. Le mélange est ajouté au contenu du bécher avec 5 mL d'acide nitrique. Le bécher est couvert d'un verre de montre et porter à douce ébullition pendant une dizaine de minutes suivi d'une évaporation à sec. Le résidu est repris dans 20 mL d'acide chlorhydrique 2 N puis chauffer jusqu'à ébullition et filtrer sur papier filtre sans cendres. Le filtrat est recueilli dans une fiole jaugée de 100 mL. Le bécher et le filtre sont rincés avec successivement 10 mL de solution d'acide chlorhydrique 2 N et deux ou trois fois avec de l'eau déionisée bouillante. La solution est refroidie et le volume est ensuite ajusté (**Rodier *et al.*, 2009**).

- ***Dosage du Fer***

Le fer réagit avec la diméthylglyoxine en présence de dithionite de sodium pour donner une coloration rose susceptible d'un dosage colorimétrique.

Le protocole expérimental est le suivant :

La prise d'essai de 50 mL s'est effectuée dans un bécher de 100 mL à 200 mL auquel 2 à 3 gouttes de HCl concentré sont ajoutées et une très petite pincée de dithionite de sodium. 10 gouttes de diméthylglyoxine constitué d'1 g de diméthylglyoxine sont ensuite ajoutées dans 100 ml d'éthanol à 95% et 20 gouttes d'ammoniaque concentrée (25%). La lecture s'est faite au spectrophotomètre à 510 nm après 10 à 15 mn de développement de la teinte rose (**AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 ; Rodier *et al.*, 2009).**

[FER] = DO x 7.57

- ***Dosage du Phosphore total***

Le phosphore peut exister dans les eaux en solution ou en suspension, à l'état minéral ou organique. Les composés phosphorés qui, sans hydrolyse ou minéralisation, répondent au test spectrophotométrique sont considérés comme étant des orthophosphates. L'hydrolyse en milieu acide fait apparaître le phosphore hydrolysable et la minéralisation, le phosphore organique. Chaque fraction (phosphore en solution ou en suspension) peut être séparée analytiquement en orthophosphates, phosphore hydrolysable et phosphore organique.

P total= P organique+ P minéral= P organique+ (P polyphosphates+ P orthophosphates)

Minéralisation de l'échantillon

La minéralisation est réalisée en présence de 10 mL d'acide sulfurique et d'1 g de persulfate de sodium à 50 mL d'échantillon qu'on introduit dans un matras, le dosage spectrophotométrie des orthophosphates est obtenus à la longueur d'onde 880 nm. La minéralisation est effectuée jusqu'à apparition d'une fumée blanche. Le contenu du matras refroidi est transvasé doucement dans une fiole de 100 mL contenant un peu d'eau distillée. 40 mL sont prélevé dans un bécher et ramener à pH 2 avec la soude. Le contenu est porté ensuite à 100 mL avec de l'eau distillée. 1 mL de réactif combiné (solution d'acide sulfurique 50 mL ; solution de tartrate double d'antimoine et de potassium 5 mL ; solution de molybdate d'ammonium 15 mL ; eau déionisée q.s.p.100 mL et 0.2 mL d'acide ascorbique) sont ajoutés au contenu. S'il y a du phosphate dans le milieu, la solution vire au bleu au bout de 5 mn. La lecture s'est faite au spectrophotomètre à la longueur d'onde 880 nm après 5 mn dans l'obscurité.

Pt= Do x 4.4 x facteur de dilution (5)

Avec le dosage des orthophosphates par spectrophotométrie, le volume de prise d'essai de 40 mL permet d'analyser des concentrations inférieures à 0,8 mg/L de phosphore. Pour des teneurs plus élevées, l'échantillon est dilué. Pour déterminer le phosphore total dissous, l'échantillon est filtré avant l'analyse sur une membrane filtrante de porosité 0,45 µm préalablement lavée avec 200 mL d'eau distillée chauffée entre 30°C et 40°C pour éliminer les phosphates (**AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 ; Rodier *et al.*, 2009).**

- ***Dosage du Chlorure***

Principe : les chlorures sont dosés en milieu acide par du nitrate mercurique en présence d'un indicateur pH à base de diphénylcarbazine et de bleu de bromophénol. Le protocole est le suivant : 100 mL de l'échantillon auquel 0.5 mL d'indicateur de pH sont ajouté, décoloré avec quelques gouttes d'acide nitrique $HN0_3$. Doser avec le nitrate mercurique jusqu'à virage au violet (**AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 ; Rodier *et al.*, 2009)**.

$[Cl^-]$= Veq x 35,5

L'indicateur de pH se prépare en dissolvant 0,5 g de diphényl carbozone et 0,05 g de bleu de bromothymol dans 100 mL d'alcool éthylique. Les chlorures proviennent des composés binaires du chlore. Ce composé est utilisé à des fins de blanchissement ; nettoyage et de désinfection.

Préparation de la solution titrante de Nitrate mercurique à 0,1N

17,13 g de nitrate mercurique sont dissous dans 50 mL à 100 mL d'eau distillée dans une fiole de 1000 mL et 1 mL d'acide nitrique concentré y sont ajouté. Le mélange est bien homogénéisé, et garder à l'obscurité pendant au moins 15 mn. Il est ensuite compléter à 1000 mL avec de l'eau distillée.

Dosage de la solution nitrate mercurique avec NaCl 0,1 N

10 mL de NaCl sont mélangé à 100 mL d'eau distillée

La solution de nitrate mercurique est dosée : Au virage à la couleur violette, 1 volume de 10 ml de nitrate mercurique est obtenu.

- ***Dosage du Sulfate $S0_4^{2-}$***

Le principe est le suivant : Les sulfates sont précipités en milieu chlorhydrique à l'état de sulfate de Baryum. Les suspensions homogènes sont mesurés au spectrophotomètre à une longueur d'onde 650 nm **(AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 ; Rodier *et al.*, 2009)**.

Mode opératoire : 100 mL de l'échantillon sont prélevés dans un erlenmeyer, 1 g de chlorure de Baryum ($BaCl_2$, $2H_20$) y est ajouté, ensuite 5 mL de réactif de sulfate $S0_4^{2-}$ constitué de 300 mL d'eau, 75 g de chlorure de sodium, 30 mL de HCL concentré, 50 mL de glycérol et de 100 mL d'alcool sont ajoutés au mélange. Le mélange est porté à l'obscurité pendant 1 min et la lecture se fait au spectro ʎ=650 nm

Si DO < 1 => $[S0_4^{2-}]$ = DO x 705.19 - 0.658

Si DO > 1 = > $[S0_4^{2-}]$ = DO x 200

- ***Dosage du Nitrate***

Principe : Les nitrates font partie des composés azotés inorganiques rencontrés dans la nature, leur présence est soit due aux bactéries, soit de façon biologique par fixation de l'azote dans l'air. Les nitrates représentent la forme finale de l'évolution de l'azote. En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitro salicylate de sodium, complexe jaune susceptible d'un dosage colorimétrique à la longueur d'onde de 415 nm (**AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 ; Rodier *et al.*, 2009)**.

Mode opératoire : 10 mL de l'échantillon sont prélevé dans une fiole, 1 mL de salicylate de sodium (0,5 mg/100 ml d'H_20) y est ajouté. On obtient un mélange qui est porté au bain marie jusqu'à évaporation. Lorsque le mélange est refroidi, quelques gouttes d'acide sulfurique concentré y sont ajoutées. Après un repos de 10 mn, quelques gouttes d'eau distillée sont ajoutées au mélange avec 5 mL de tartrate de sodium. Le volume du mélange est ajusté à 100

mL avec de l'eau distillée et porté à l'obscurité pendant 10 mn. La lecture se fera au spectromètre à une longueur d'ondé ʎ = 415 nm

Expression des résultats : $[N0_3^-] = D0 \times 60$

- ***Dosage du Nitrite $N0_2^-$***

Les nitrites ont été dosés par la méthode spectrophotométrique d'absorption moléculaire. La verrerie est préalablement lavée soigneusement avec une solution d'acide chlorhydrique à environ 2 mol/L et rincée abondamment à l'eau distillée. Le principe est basé sur la réaction des ions nitrites présents dans une prise d'essai, à pH = 1,9 avec le réactif amino-4 benzène sulfonamide ($C_6H_4SO_2N_2H_4$) en présence d'acide orthophosphorique pour former un sel diazoïque qui forme un complexe de coloration rose avec le chlorhydrate de N-(naphtyl-1) diamino-1,2-éthane (ajouté avec le réactif amino-4 benzène sulfonamide).

Le protocole d'analyse peut-être résumé ainsi 1 mL de réactif 1 (solution acide de sulfanilamide à 10 g/L) est ajouté à la prise d'essai (10 mL), l'ensemble est agité vigoureusement et laissé au repos (2 à 8 minutes) et enfin 1 mL de réactif 2 (solution de N-(1-naphthyl)-éthylène diamine à 1 g/L) est ajouté. Après 15 minutes, la lecture de l'absorbance est faite à la longueur d'onde de 543 nm au spectrophotomètre. La concentration en nitrite, exprimée en µmol/L, correspondant à la valeur de l'absorbance, est déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage tracée avant analyse **(AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 ; Rodier *et al.*, 2009**).

- ***Dosage du Calcium***

Le principe du dosage est de complexer les ions calcium avec l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique). Le calcon est utilisé comme indicateur coloré et forme un complexe rouge avec le calcium. Lors du dosage, les ions calcium réagissent avec l'EDTA; d'abord les ions libres puis ceux combinés avec l'indicateur qui vire alors de la couleur rouge à la couleur bleu clair **(AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 ; Rodier *et al.*, 2009)**.

Réactifs :

Le Calcon est obtenu après mélange de 0,2g d'acide calcone carboxylique ($C_{21}H_{14}N_{2O}7S,3H_2O$) et 100 g de chlorure de sodium.

Le protocole est résumé ainsi : l'échantillon d'eau est dilué 5 fois. A l'aide d'une pipette, 50 mL exactement de cette solution sont introduit dans un bécher. 2 mL de la solution

d'hydroxyde de sodium (2M) (8 g d'hydroxyde de sodium dans 100 mL d'eau) y sont ajoutés ainsi qu'une pincée de l'indicateur acide calcone carboxylique. Le mélange obtenu est dosé immédiatement avec une solution d'EDTA (0,931 g de sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$, $2H_2O$) dans de l'eau) tout en continuant de mélanger. En fin de dosage, le mélange est versé lentement. Le virage est atteint lorsque la couleur devient nettement bleue. La couleur ne doit plus changer avec l'ajout d'une goutte supplémentaire de la solution d'EDTA.

Expression des résultats :

[Ca2+] = 5000.V1.M1/V2 (mM)

V1 : volume de la solution d'EDTA utilisé pour le dosage (mL).

V2 : volume d'échantillon dosé (mL)

M1 : molarité de la solution d'EDTA (M)

II-2-3 Mise en culture des échantillons d`eaux et de sédiments

Au laboratoire, 500 g de chaque échantillon de sédiments et 100 mL d'eau, provenant de chaque point de collecte, ont été prélevé pour la culture.

Les échantillons d`eaux et de sédiments récoltés ont été traités selon la méthode décrite par Stinear et collaborateur (**méthode adaptée**). Pour la mise en culture, les différentes manipulations ont été réalisées sous PSM de niveau 2.

- **Traitement des échantillons d'eaux**

50 mL d'eau sont centrifugés à 13000 trs/min pendant une heure, le culot est ensuite récupéré dans un nouveau tube de Falcon et mélangé avec 50 mL du même échantillon. Cette procédure permet ainsi d'obtenir un échantillon plus concentré.

- **Traitement des échantillons de sédiments**

Dans un tube Falcon de 50 mL de capacité, 10 g de sédiments ont été mélangés à 40 mL d'eau distillé stérile selon la méthode décrite par **Kankya et *al.*, (2011)** légèrement modifiée. Le mélange est agité 2 min sur agitateur magnétique, on laisse décanter quelques minutes. Ensuite, le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de Falcon stérile de 50 mL.

- **Coloration de Ziehl-Neelsen**

Cette coloration a été réalisée afin de détecter les Mycobactéries en présence dans l'échantillon. La coloration a été réalisé directement à partir d´une goutte de l'échantillon (eaux et sédiment), un frottis mince ayant 2 cm de longueur et 1 cm de largeur a été réalisé sur une lame porte objet. Ce frottis est coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen (ZN) après avoir été fixé à l`alcool, puis à la flamme. La coloration est réalisée en recouvrant la lame porte-objet par une solution de Fushine phéniqué à 1% puis l´ensemble sera chauffé 3 fois pendant 10 min. Après avoir éliminé l'excès de colorant par rinçage, la lame est recouverte d'une solution d'acide-alcool pendant 5 min. Après avoir éliminé l'excès d'acide-alcool et rincé le frottis, la lame est une fois de plus recouverte d'une solution de bleu de méthylène à 1%. Une fois les étapes de coloration achevées, le frottis coloré est séché à l'air puis examiné à immersion au microscope optique à l'objectif x100. Elle est longue car le champ observé est petit. Les bacilles Acido-Alcoolo-Résistants (B.A.A.R.) apparaissent rouges sur fond bleu (décrites en annexes).

- **Décontamination des échantillons d'eaux et de sédiments**

La décontamination des échantillons d'eau et du surnageant de sédiment récupéré ont été réalisée avec le Chlorure de Cetylpiridium CPC (0,1%) (**Stinear *et al.,* 2004**). 25 mL de l'échantillon préalablement traité est mis en contact avec 25 mL de CPC (0,1%) pendant une semaine à température ambiante. Les Mycobactéries possèdent une résistance naturelle au détergents tels que : le Chlorure de Cetylpiridium qui stimule la croissance de nombreuses MNT avec des contaminations faibles en bactéries interférentes (**Stinear *et al.,* 2004**). Ce traitement réduit ainsi la contamination et augmente le rendement des cultures (**Smithwick *et al.,* 1975 ; Selvakumar *et al.,* 1995**). Après une semaine, le mélange est centrifugé à 13000 trs/min pendant une heure, le culot est ensuite neutralisé avec 20 mL du tampon phosphate, suivi d'une centrifugation à 13000 trs/min pendant une heure. 5 mL de tampon phosphate est ajouté au culot et quelques gouttes sont ensemencé sur les différents milieux. Les différents milieux : Löweinstein Jensen (LJ), Gélose ordinaire et Middlebrook 7H10 ont été utilisés pour l'ensemencement des échantillons. Le milieu Löweinstein Jensen (LJ) a été utilisé pour la primoculture. Une observation quotidienne a été faite jusqu'à obtention de colonie. Pour confirmer la présence d'une Mycobactérie, une coloration de Ziehl neelsen ainsi qu'une coloration de Gram ont été systématiquement effectuée à partir de toutes les colonies obtenues. Un microscope optique (Zeiss®) a servi pour l`observation des bacilles acido-alcolo résistants après la coloration de Ziehl-Neelsen (**Barksdale & Kim, 1977**).

II-2-3-1 Techniques microscopiques

Les examens microscopiques ont été réalisés sur les colonies obtenues. Selon **Barksdale et Kim** (**1977**), une quantité minime de fuchsine pénétrant dans le corps bactérien formerait des complexes avec les groupements carboxyles libres des acides mycoliques situés à la partie la plus externe de la bactérie. Ces complexes constitueraient une barrière hydrophobe qui emprisonne la fuchsine à l'intérieur du corps bactérien. La brillance de la coloration, par contre serait due à la grande quantité de fuchsine pénétrant à l'intérieur du bacille. Sur les tubes ensemencés contenant des colonies visibles et évocatrices de souches de Mycobactérie, l'examen microscopique a été réalisé directement à partir d´une colonie du tube de culture delayée dans une goutte d´eau physiologique, un frottis mince ayant 2 cm de longueur et 1 cm de largeur a été réalisé sur une lame porte objet. Ce frottis est coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen (ZN) comme décrit précedemment. Les colonies BAAR positives sont ensuite colorées par la coloration de Gram.

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est ensuite réalisée sur les colonies obtenues afin d'identifier les bacilles acido-alcolo résistants (BAAR) facultatifs tels que *Norcadia*, *Rhodococcus*, du genre *Mycobacterium* recherché. La lame porte-objet est recouverte d'une solution de gentiane qui colore le cytoplasme des bactéries pendant 30 secondes. Après avoir éliminé l'excès de colorant, la lame est recouverte de lugol qui permet de fixer le violet dans les bactéries pendant 60 secondes. La lame est ensuite recouverte d'une solution d'alcool-acetone jusqu'à ce que le violet ne s'ecoule plus du frottis. Après avoir éliminé l'excès d'alcool-acetone et rincé le frottis, la lame est une fois de plus recouverte d'une solution de fuschine pendant 30 secondes. Une fois les étapes de coloration achevées, le frottis coloré est séché à l'air puis examiné à immersion au microscope optique à l'objectif x100. Toutes les colonies qui sont BAAR facultatifs apparaissent rouges sur fond bleu, et sont ainsi éliminés. Toutes les colonies BAAR positives retenues ont été ensuite repiquées sur du Löweinstein-jensen puis identifiées en utilisant certains tests biochimiques (**David *et al.*, 1986**).

II-2-3-2 Identification phénotypique

Les caractères phénotypiques pris en compte dans la culture sont ceux décrits par **Runyon et collaborateur** (**1959**). Les Mycobactéries sont classées selon leur vitesse de croissance

(mycobactérie à croissance rapide (moins (-) de 8 jours) et mycobactérie à croissance lente (plus (+) 8 jours). Egalement, la température d'incubation, l`aspect des colonies, observable à la loupe, soit des colonies eugoniques (rugueuse, colonies à développement progressif pouvant atteindre 1 cm de diamètre) de type R(rough) ou S (smooth), ou colonies dysgoniques (lisse, colonies restant toujours petites, de l'ordre du mm de diamètre, elles s'incrustent parfois dans la gélose) de type R ou S, la pigmentation, notamment, beige chamois, jaune, orange, rose, rouge ou non, sont pris en compte dans l'identification **(David, 1986 ; Euzeby, 2010).**

- ***Epreuve de photo-induction***

A partir de colonies suffisamment développées, mais non vieillies (donc en phase logarithmique de croissance), un repiquage est réalisé sur les milieux LJ et Middlebrook 7H10 ensemencés en duplicat. Un lot de chacun de ces derniers a été emballé dans du papier aluminium et un autre lot est exposé à la lumière (lampe de 60 watts placée à 25 cm de la culture) pendant au moins une heure. Les deux lots de tubes sont remis à 23°C et 37°C dans des étuves pendant 24 heures. Si les colonies soumises à la lumière ont pris, lors de la remise en végétation, une pigmentation jaune, orangée ou rouge, par rapport au tube emballé dans le papier aluminium, la souche est dite **photochromogène**. Si la culture est pigmentée dans les deux tubes, la souche est dite **scotochromogène**. Si aucune pigmentation n'apparaît dans le tube entouré de papier aluminium, ou dans le tube exposé à la lumière, la souche est dite **non chromogène**.

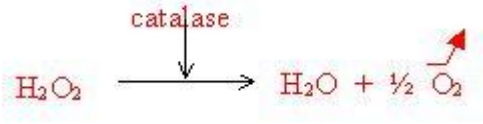
II-2-3-3 Identification biochimique des souches

L'identification biochimique des Mycobactéries a été réalisée sur la base de la classification de Runyon (**Timpe & Runyon, 1954**). Cette classification est basée sur la vitesse de croissance et sur la pigmentation que prennent les souches dans différentes conditions. C'est cette méthode qui est toujours utilisée pour caractériser les nombreuses espèces de Mycobactéries qui continuent d'être décrites actuellement. La mise en évidence de ces caractères constitue une première orientation qui sera complétée pour identifier les espèces au sein de 4 groupes (groupe I, II, III, IV) par d'autres tests biochimiques. Selon le délai de croissance, toutes les souches obtenues étaient identifiées selon les caractères d`identification des Mycobactéries à croissance rapide (Groupe IV). Plusieurs tests d`identification ont été réalisés, notamment la croissance sur gélose ordinaire (trypto-caséine soja) à 37°C, 42°C, 45°C, 52°C, la croissance en présence 5% de chlorure de sodium (NaCl), la production de

catalase pour la recherche de l'activité catalasique à 22°C et 68°C, La croissance en présence de 5% de chlorure de sodium (NaCl), l`utilisation du citrate de sodium comme unique source de carbone, ainsi que l`utilisation du mannitol comme unique source d'énergie .

- **Catalase** (**Recherche de l'activité catalasique à 22°C et 68°C**)

Toutes les Mycobactéries produisent une catalase sauf les souches de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* résistantes à plus de 10 µg/mL d'isoniazide (INH). Pendant leur respiration aérobie, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce à des enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme soluble, intracellulaire, est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Pour rechercher l'activité catalase à 22°C et 68°C, quelques colonies pures de Mycobactéries à partir d'une subculture sont incubées dans 1ml de bouillon catalase pendant 1 heure à la température ambiante et dans un bain marie. La lecture des résultats est basée sur l'observation d'une mousse blanche à la surface du bouillon, traduisant une activité catalase positive de la souche étudiée (**Carbonelle *et al.*, 1983 ; Mahon *et al.*, 2007 ; Euzéby, 2010**).

- **Croissance sur gélose ordinaire** (trypto-caséine soja)

Cette technique permet la confirmation des Mycobactéries atypiques. A partir d'une subculture, préparer une suspension à 1 mg de germes/mL. Avec une anse de platine préalablement stérilisée, effectuer un isolement en stries (ensemencer en réalisant des stries serrées en remontant l'inoculum avec l'anse de platine). Incuber le tube en position verticale à 30°C pendant 10 jours. Le test est positif après croissance en 3 à 5 jours (**Mahon *et al.*, 2007 ; Euzéby, 2010**).

- **Croissance en présence 5% de chlorure de sodium (NaCl)**

Cette technique permet de mettre en évidence les Mycobactéries capables de pousser en présence de 5% de chlorure de sodium (NaCl) (halotolérantes). La tolérance à la salinité est évaluée par la mise en culture d'une suspension bactérienne à 1 mg de germes/ml sur le milieu LJ-NaCl 5% à 37°C. Le résultat est positif si après 28 jours d'incubation plus de 50

colonies (quelle que soit leur taille), sont visibles sur le milieu contenant 5% de NaCl. L'absence de croissance après 4 semaines d'incubation sur le milieu contenant 5% de NaCl est un résultat négatif (**Mahon *et al.*, 2007; Euzéby, 2010**).

- **Croissance sur milieu Mannitol**

Cette technique permet de mettre en évidence les Mycobactéries capables d'assimiler les sucres simples présents dans le milieu par voie oxydative. A partir d'une subculture, préparer une suspension à 1 mg de germes/mL. A l'aide d'une pipette pasteur montée d'une poire, distribuer 1 à 2 gouttes de la suspension au fond du tube de Mannitol. Incuber le tube en position verticale à 30°C. Une réaction positive se traduit par un virage du milieu de la couleur rouge à orange (**Mahon *et al.*, 2007 ; Euzéby, 2010**) .

- **Croissance sur milieu Citrate de Simmons**

Cette technique permet de mettre en évidence les Mycobactéries hétérotrophes présentes dans le milieu. A partir d'une subculture, préparer une suspension à 1 mg de germes/mL. A l'aide d'une pipette pasteur montée d'une poire, distribuer 1 à 2 gouttes de la suspension au fond du tube de Citrate de Simmons. Incuber le tube en position verticale à 30°C. Une réaction positive se traduit par un virage du milieu de la couleur verte au bleu (**Mahon *et al.*, 2007; Euzéby, 2010**).

II-2-4 Analyses moléculaires

II-2-4-1 Extraction de l'ADN

Les méthodes d'extractions chimiques utilisées au cours de ce travail sont celles décrites par **Ausubel *et al.*** (**1989**) utilisant comme composés chimiques le phénol et le chloroforme.
A partir d'une culture jeune de Mycobactéries sur milieu gélosé, quelques colonies de Mycobactéries sont prélevées et remises en suspension dans un cryotube contenant 2 mL d`eau pour préparation injectable.

- **Précipitations des acides nucléiques**

Cent microlitres de cette suspension ont été déposé dans un micro tube de 1,5 mL suivi d`une centrifugation à 13000 trs/min pendant 15 min. le culot est ensuite resuspendu dans 300 µL de tampon de lyse (NaOH 50 mM, Tris-EDTA 20 mM, du NaCl 150 mM et du SDS 1%), suivi d`un chauffage à 60°C pendant 1 heure. Quatre cent microlitres (400 µL) du mélange

phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1) ont été ensuite ajoutés à l`échantillon, suivi d`un mélange au vortex pendant 2 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 13000 trs/min pendant 2 min. La phase supérieure contenant l'ADN est récupéré dans un nouveau tube, auquel est ajouté 2 volumes d`éthanol (100%) glacial. Le mélange est ensuite incubé à -80$^{o}$C pendant 2 heures, suivi d`une centrifugation à 13000 trs/min pendant 10 min.

- **Lavage des acides nucléiques**

Le surnageant est éliminé par retournement des tubes et le culot visible est lavé avec de l`éthanol 70% glacial. Le mélange est centrifugé à nouveau à 13000 trs/min pendant 10 min et le pellet est séché pendant 20 min à température ambiante.

- **Récupération de l'ADN**

Le culot séché obtenu est repris dans 50 µL de tampon d`élution (10 mM Tris, 1 mM EDTA, eau PPI) contenant de la Rnase à 20 µg/mL. L`ADN est conservé à -20°C pour les analyses.

II-2-4-2 Amplification génique par PCR

L`amplification des séquences IS6110 et MIRU-VNTR a été réalisée en présence d`amorces spécifiques à chaque séquence (Tableau 1).

Chaque extrait d`ADN (5 µL) est mis en présence de tampon10X, de chlorure de magnésium (25mM), du DNTP 10 µM, de copies d`amorces spécifiques à chaque séquence (IS6110 et MIRU VNTR), de 0,2 µL de DNA Taq polymérase (Hot Start Taq) dans un volume final de 50 µL.

Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium (BET). La visualisation est réalisée sous lumière UV à partir d'un système automatisé (Gel documention, Bio-Rad Laboratories USA).

- ***Typage moléculaire par MIRU- VNTR***

Pour les analyses génétiques multilocus, les marqueurs minisatellites suivants : MIRU 1, LOCUS 6, VNTR 19 et ST1 ont été étudiés comme décrit par Ablordey *et al.*, Stragier *et al.*, Hilty *et al.* **(Ablordey *et al.*, 2005b ; Stragier *et al.*, 2006 ; Hilty *et al.*, 2006)**. Ces

marqueurs ciblent des régions variables intergéniques répétées en tandem et dispersées dans le génome de la mycobactérie. Ce sont des régions pouvant exprimer un polymorphisme génétique (variation allélique) de la mycobactérie. Le génotypage par les minisatellites de type VNTR est essentiellement basé sur l'amplification par PCR utilisant des amorces spécifiques de régions conservées du génome bactérien et sur la détermination de la taille des amplicons après migration électrophorétique. La taille des fragments amplifiés définissant un marqueur génétique spécifique d'un locus donné connue et correspond à un nombre de répétitions numériquement défini suivant la taille de ce dernier. Le résultat de l'analyse a donc été défini par un code numérique correspondant au nombre de répétitions observées au niveau de chaque locus VNTR. Aussi, le pouvoir de résolution d'un tel système de typage est donc lié au nombre de marqueurs utilisés. La détection des marqueurs VNTR a été réalisée sur toutes les souches à la fois positives et négatives pour les séquences d'insertion *IS6110 et* IS*2404*. Les réactions d'amplification pour chaque locus se sont faites comme décrit par Stragier *et al.* **(Stragier *et al.*, 2006)**. La réaction a été effectuée dans un volume final de 50 µL contenant : 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 1.5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM de chaque déoxynucléotide triphosphate (dNTPs) ; 0,4 µM de chaque oligonucléotide (amorces sens et anti- sens), 1 U de *Taq* DNA polymerase (Promega) et 5 µL d´ADN. Le mélange réactionnel est incubé dans un thermocycler de type Gene Amp 9700 (Applied Biosystem®) selon les conditions d'amplification : l'amplification des marqueurs **Miru 1, Locus 6, VNTR 19** a démarré par une dénaturation initiale de 2 min à 95°C, suivit d'une étape cyclique répétée 35 fois comprenant une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, une phase de fixation des amorces de 1 min à 58°C et une phase d'élongation de 1 min à 72°C. A la fin de la phase cyclique une élongation finale de 10 min à 72°C a interrompue les réactions d´amplification.

L'amplification du marqueur **ST1** a débuté par une dénaturation initiale de 2 min à 95°C, suivi d'une étape cyclique répétée 35 fois comprenant une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, une phase de fixation des amorces de 1 min à 65°C et une phase d'élongation de 1 min à 72°C. A la fin de la phase cyclique une élongation finale de 10 min à 72°C a interrompue les réactions d´amplification.

II-2-4-3 Migration et visualisation des produits d'amplification

Les produits d'amplification ou amplicons issus de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose contenant un agent intercalant : le bromure d'éthidium (BET) à 1%.

L'électrophorèse a consisté au déplacement de molécules chargées dans un champ électrique en tenant compte de leur taille. 10 µl de l'amplicon sont distribués dans chaque puit du gel. Le gel d'agarose permet de séparer l'ADN linéaire sur la base de la taille, par la migration de l'ADN vers la matrice sous l'influence d'un champ électrique à 130 mV pendant 20 min. L'électrophorèse a consisté au déplacement de molécules chargées dans un champ électrique en tenant compte de leur taille. 10 µl de l'amplicon sont distribués dans chaque puit du gel

Interprétations des résultats du typage moléculaire

Après migration sur gel d'agarose, une approximation des tailles des fragments d'ADN amplifiés a été réalisée après la lecture des distances de migration en présence du marqueur de poids moléculaire SmartLadder Small Fragment (Eurogentec). Les fragments d'ADN ont été comparés à la table de référence des MIRU- VNTR de *M. ulcerans* et aux résultats obtenus avec les souches de référence utilisées **(Tableau III)**. La taille des amplicons a été utilisée pour déterminer le nombre de répétitions et les résultats ont été donnés sous forme de code caractérisant un type de polymorphisme.

Tableau III : Profils VNTR de *M. ulcerans* et d'autres MPM basé sur le nombre de répétitions au niveau des différents loci (MIRU1, locus6, ST1, et Locus 19) (Williamson *et al.*, 2008).

	VNTR Profile	MIRU1	Locus 6	ST1	Locus 19
M. ulcerans (Human Ghanaian isolates)					
1054	B	3	1	1	
1055	B	3	1	1	
1057	B	3	1	1	
1063	B	3	1	1	
Agy99	C	3	1	2	
1059	A	1	1	1	
M. marinum (Marine fish isolates)					
DL150991	D	1	4	2	2
DL240490	D	1	4	2	2
DL045	D	1	4	2	2
DL180892	D	1	4	2	2
SA200695	D	1	4	2	2
SR030597	D	1	4	2	2
CF030494	D	1	4	2	2
2790995	D	1	4	2	2
DL300/04 (Italy from Concrete)	E	1	2	1	2
CC240299 (Freshwater fish isolates)	E	1	2	1	2
BB170200 (Freshwater fish isolates)	E	1	2	1	2
M. pseudoshottsii (freshwater fish)					
L15	D	1	4	2	2
L58	D	1	4	2	2
M. liflandii (African, US imported frogs)					
Xt128f	F	1	2	2	1
Xl5	F	1	2	2	1
1138	F	1	2	2	1

II-2-4-4 PCR Real time

La PCR en temps réel a été utilisé pour l`amplification des gènes IS2404 (séquence d`insertion de *Mycobacterium ulcerans*, responsable de l`Ulcère de Buruli (UB) et KR (enzyme de la toxine, la Mycolactone responsable des ulcérations dans le cas de l`UB).

- **Principe**

La technique de PCR en temps réel consiste à mesurer à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN amplifiée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une estimation de la quantité initiale d'ADN. Les données de fluorescence sont transformées en logarithme afin de linéariser la phase exponentielle d'amplification en fonction du nombre de cycles. Ce segment est modélisé par l'équation :

Log [ADN]=a (nombre de cycle) + b

La pente a est dérivée de l'efficacité de PCR

b correspond à la quantité d'ADN au cycle 0, on obtient ainsi la quantité d'ADN initiale.

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR point final) ou au cycle n<40 (PCR semi-quantitative). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un "quencher" soit la nécessité d'un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé "**Ct**" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

- **Préparation du Mix**

L'amplification des séquences IS2404 et Kr a été réalisée en présence d`amorces spécifiques à chaque séquence (Tableau 1) dans un volume réactionnel final de 50 µL. Les différentes réactions ont été effectuées dans un volume final de 25 µL contenant 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 1.5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM de chaque déoxynucléotide triphosphate (dNTPs),

0,3 µM de chaque amorces, 0,25 µM de sonde, 0,5 µL de l'atténuateur de bruit de fond (Rox Dye pure), 1 U de *Taq* DNA Polymerase (Promega) et 5 µL d'ADN total extrait. Le mélange réactionnel d'un volume total de 25 µL a été incubé dans un appareil STEP ONE PLUS selon le programme suivant : Un cycle de 2 min à 50°C, puis d'une dénaturation initiale de 5 min à 95°C, suivi 35 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. La collecte de la fluorescence se fait au cours de l'incubation pour les phases simultanées de fixation des amorces et d'élongation (60°c pendant 1 min).

II-2-5 Analyse statistique

- **Déterminisme de la prolifération des Mycobactéries**

Pour étudier l'association entre les paramètres physico-chimiques étudiés et la présence des Mycobactéries dans les plans d'eau, le logiciel «R» a été utilisé. En effet, R est à la fois un logiciel statistique et un langage de programmation spécialisé dans le calcul scientifique et l'analyse statistique des données. Il est à la fois un langage informatique et un environnement de travail. Les différentes moyennes des paramètres physico-chimiques ont permis de réaliser une modélisation par arbre de décision. Cet arbre de décision nous permettant d'identifier les paramètres favorables à la présence des Mycobactéries au niveau des sites étudiés. L'outil d'analyse utilisé pour les différentes corrélations, est l'Analyse en Composante Principale (ACP). L'analyse a été effectuée sur une matrice de 473 échantillons et 15 variables avec le logiciel R. Les résultats obtenus sont donnés sous forme de tableaux et de graphiques. Le Test statistique de Krustal Wallis (test non paramétriques de comparaison) a été utilisé pour la comparaison de la distribution des données. Ainsi, deux hypotheses ont été émises :

- Ho: Pas de différence significative entre la distribution des paramètres physico-chimique au niveau des sites
- H1: Différence significative entre la distribution des paramètres physico-chimique au niveau des sites
- Si p-value > α, alors accepter Ho
- Si p-value < α, rejeter Ho (et considérer H1 comme vraie); avec α =5%

.

III- RESULTATS ET DISCUSSION

III-1 Résultats

III-1-1 Répartition des échantillons en fonction des sites d'étude

Dans cette étude, un total de 22 stations ont été retenues reparties comme suit :

11 stations sur la Lagune Aghien, 3 sur la Retenue d'Adzopé, 2 stations ont été retenues respectivement sur les sites de Sokrogbo, de Bodo et d`Adiopodoumé. Une station a été retenue sur le seuil d'Agboville ainsi que sur la retenue de Loka à Bouaké.

Un total de 473 échantillons a été obtenu des sites de prélèvement sur une période d`un an (Juin 2014- Juillet 2015). Les échantillons étaient composés de 222 sédiments et 251 échantillons d`eaux. L`effectif de chaque échantillon collecté en fonction des sites de prélèvement est contenu dans le **Tableau IV**.

Tableau IV : Nombre d'échantillons par site de prélèvement

SITES DE PRELEVEMENT								
	Adzopé	**Adiopodoumé**	**Tiassalé**		**Agboville**	**Aghien**	**Bouake**	
			Sokrogbo	**Bodo**				
Eaux	45	18	18	6	15	143	6	251
Sédiments	16	18	18	6	15	143	6	222
TOTAL	61	36	36	12	30	286	12	473

III-1-2 Identification microbiologique des Mycobactéries environnementales

III-1-2-1 Identification microscopique

La coloration de Ziehl Neelsen a été effectuée sur tous les échantillons d'eau et de sédiments préalablement traités. Sur les 473 échantillons, 70 (14,8%) possédaient des bacilles acido-alcoolo résistants.

Tous les échantillons décontaminés au cetylpiridium à 0,1% ont été mis en culture sur les différents milieux jusqu`à obtention de colonies. Le délai de croissance des colonies obtenues était de moins de 7 jours. Apres obtention de colonies, la coloration au Ziehl Neelsen s'en est suivie pour la recherche des Bacilles acido-alcoolo résistants. Après observation au microscope des colonies obtenues, 65 étaient des BAAR positives, soit 13,74% contre 408 BAAR négatives (86,25%). Des 65 colonies identifiées comme étant des BAAR positives (**Tableau V**). Sur les 65 BAAR positives, après coloration de Gram, aucune ne présentait une acido-alcoolo résistance facultative.

Tableau V : Caractères microscopiques des colonies

SITES DE PRELEVEMENT								
	Adzopé	**Adiopodoumé**	**Tiassalé**		**Agboville**	**Aghien**	**Bouake**	
			Sokrogbo	**Bodo**				
❖ **BAAR +**	12	7	9	6	7	23	1	65
❖ **BAAR -**	49	29	27	6	23	263	11	408
TOTAL	61	36	36	12	30	286	12	473

❖ BAAR (+) : Bacilles Acido-Alcoolo résistants positifs ; BAAR (-) : Bacilles Acido-Alcoolo résistants négatifs

III-1-2-2 Identification phénotypique

- **Caractères culturaux**

La coloration Ziehl Neelsen avant et après culture, le délai d'apparition, la morphologie ainsi que la coloration de Gram sont les premières caractéristiques dans l'identification des Mycobactéries afin de différencier le genre *Mycobacterium* des genres *Norcadia, Rhodococcus et Corynebacterium*.

L'étude morphologique a révélé la diversité des souches mycobactériennes isolées au niveau des différents sites. Différentes formes de bacilles ont été inventoriées au microscope : des coccobacilles, des bacilles courts ou longs (par rapport au *M. tuberculosis* H37Rv), des bacilles filiformes, et des bacilles de grande taille. En fonction de l`aspect des colonies, 8 colonies étaient des colonies Rugueuses (Rough (R) (12,3%), elles provenaient des sites d`Aghien et d`Adzopé et 57 colonies étaient des colonies lisses (Smooth (S) (87,69%). Aucune des colonies n`étaient à la fois rugueuses et lisses. En fonction du test de photoinduction, aucune souche n`était Scotochromogène, 3 étaient Photochromogènes et 62 non Chromogènes (**Tableau VI**) (**Figure 9**). Aucune Mycobactérie à croissance lente n`a été isolée, elles étaient toutes des Mycobactéries à croissance rapide.

Tableau VI : Pigmentation des colonies

SITES DE PRELEVEMENT								
	Adzopé	**Adiopodoumé**	**Tiassalé**		**Agboville**	**Aghien**	**Bouake**	
			Sokrogbo	**Bodo**				
Scotochromogène	0	0	0	0	0	0	0	0
Photochromogène	1	0	0	1	1	0	0	3
non Chromogènes	11	7	9	5	6	24	0	62

Figure 9 : Souche de Mycobactéries à croissance rapide sur Gélose ordinaire (photo : Vakou, 2016), Colonie à aspect lisse, non pigmentée à la lumière (souche achromogène)

Au Total, 29 souches (44,61 %) ont été identifiées dans l'eau contre 36 (55,38%) dans les sédiments. Les sédiments étaient les plus contaminés par les Mycobactéries avec 55,38% de présence contre 44,61% pour les échantillons d'eau (**Tableau VII**). 7 espèces ont été identifiées dans cette étude. Ces espèces se retrouvaient en majorité à Adzopé. Les espèces identifiées étaient réparties en fonction du type d`échantillon. La photo-induction a permi d'identifier *Mycobacterium smegmatis* qui est la seule mycobactérie qui présentait une pigmentation jaune à la lumière dans cette étude. Toutes les mycobactéries présentaient une catalase thermostable à 22°C et 68°C.

- **Croissance sur gélose ordinaire à 30 °C**

Les espèces de Mycobactéries mises en évidence sont : *M. peregrinum, M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus, Mycobacterium sp*.

- **Croissance en présence 5% de chlorure de sodium (NaCl)**

Cette technique a permis de mettre en évidence les Mycobactéries capables de pousser en présence de 5% de chlorure de sodium (**NaCl +**) (halotolérantes) qui sont : *M. peregrinum, M. abscessus* et les Mycobactéries 5% (**NaCl -**) non halotolérantes qui sont : *M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, Mycobacterium sp.*

- **Croissance sur milieu Mannitol**

Les Mycobactéries halotolérantes en présence sont : l'espèce *M. peregrinum* **Mannitol (+)** et l'espèce *M. abscessus* **Mannitol (-)**. Chez les Mycobactéries non halotolérantes qui sont : *M. mucogenicum* **Mannitol (+),** *M. immunogenicum, M. chelonae, Mycobacterium sp* **Mannitol (-).**

- **Croissance sur milieu Citrate de Simmons (CS)** : l'espèce *M. chelonae* ***CS*** **(+)** et l'espèce *M. immunogenicum,* **CS (-),** *Mycobacterium sp* **CS *(-)*.**

- Concernant l'identification microbiologique des Mycobactéries, les espèces *M. peregrinum, M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus, Mycobacterium sp*.ont été isolés. L`espèce *M. peregrinum* (13,84%) et *Mycobacterium sp.* (56,9%) ont été les plus fréquentes au niveau de tous les sites **(Tableau VIII)**.

Tableau VII : Nombre de souches isolées par site en fonction du type d`échantillon

	N : Nombre de souches isolées par échantillon							
			Tiassalé N(%)					
	Adzopé N(%)	**Adiopodoumé N(%)**	**Sokrogbo**	**Bodo**	**Aghien N(%)**	**Agboville N(%)**	**Bouaké N(%)**	**Total**
Eaux	5 (17,85)	3 (10,71)	3 (10,71)	2 (7,14)	13 (46,42)	3 (10,71)	0	29 (44,61)
Sédiments	7 (18,91)	4 (10,81)	6 (16,21)	4 (13,51)	11 (29,72)	4 (10,81)	0	36 (55,38)
TOTAL	12 (18,46)	7 (10,76)	9 (13,84)	6 (9,23)	24 (36,92)	7 (10,7)	0	65

Tableau VIII : Espèces de Mycobactéries identifiées par site

	Adzopé	Adiopodoumé	Tiassalé		Bouake	Agboville	Aghien	Total
			Sokrogbo	Bodo				
M. peregrinum	5	1	1	0	0	2	4	13
M. smegmatis	1	0	0	1	0	1	0	3
M. immunogenicum	0	0	0	1	0	1	0	2
M.chelonae	1	0	0	0	0	0	1	2
M. mucogenicum	3	0	0	4	0	0	0	7
M. abscessus	1	0	0	0	0	0	0	1
Mycobact. sp	1	5	8	0	0	3	20	37
TOTAL	12	6	9	6	0	7	25	65

III-1-3 Identification moléculaire des Mycobactéries environnementales

- **PCR conventionnelle**

Toutes les espèces obtenues ont été analysés par PCR conventionnelle afin de rechercher la séquence IS6110, caractéristique de quelques Mycobactéries et le typage moléculaire par MIRU-VNTR pour la recherche des différents profils. La séquence IS6110 a été retrouvée au niveau de 4 souches sur 26 souches de Mycobactéries (**Tableau X**).

- **PCR Temps Réel**

Toutes les espèces obtenues ont été analysés par PCR, ciblant les séquences d`insertion IS2404, présente en 200 copies sur le génome de *M. ulcerans* et la Ketoréductase (Kr) (**Figure 10**), gène de synthèse de la mycolactone, toxine responsable d`ulcérations cutanées. 9,23% des souches isolées ont abrité le gène de la Ketoréductase (Kr), Ces 2 séquences ont été retrouvés chez les espèces à croissance rapide isolées : *M. peregrinum*, *M. mucogenicum* et *Mycobacterium sp* (**Tableau IX**).

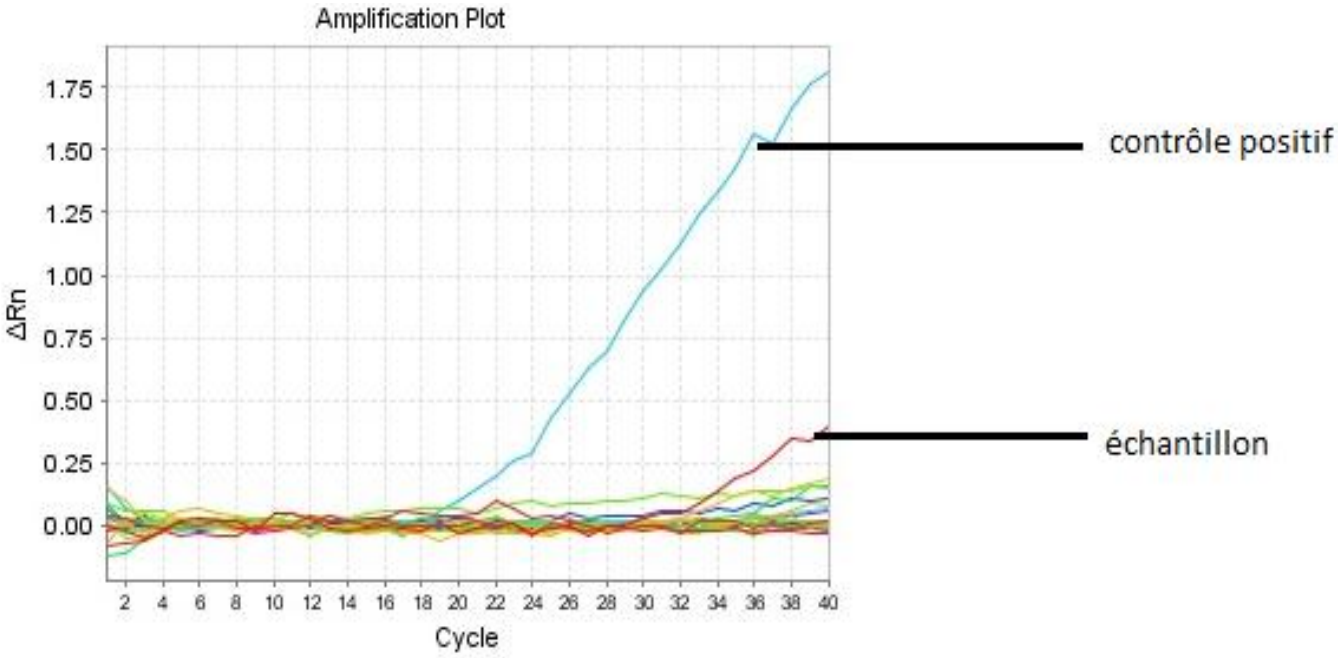


Figure 10 : Détection de la ketoréductase (Kr) des souches par PCR en Temps Réel

Tableau IX : Caractéristiques moléculaires des espèces de Mycobactéries identifiées par sites

Site	Espèces de Mycobactéries	IS6110	IS2404	Kr
Adzopé	*M. smegmatis*	-	-	-
Adzopé	*M. peregrinum*	+	-	-
Adzopé	*M.mucogenicum*	+	-	-
Adzopé	*M. mucogenicum*	-	+	+
Adzopé	*M. mucogenicum*	-	+	+
Adzopé	*M. peregrinum*	-	-	+
Abgoville	*Mycobacterium sp.*	+	-	-
Abgoville	*M.smegmatis*	-	-	+
Abgoville	*M. immunogenicum*	-	-	-
Aghien	*M. peregrinum*	-	-	-
Aghien	*Mycobacterium.sp*	+	-	-
Aghien	*Mycobacterium. Sp*	-	-	-
Aghien	*M.peregrinum*	-	-	-
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-
Bodo	*M. mucogenicum*	-	+	-
Bodo	*M.mucogenicum*	-	-	-
Adiopodoumé	*M. peregrinum*	-	+	+
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	-	-	-
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	-	+	+
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	-	+	-

- IS2404 : séquence d`insertion retrouvée chez *Mycobacterium ulcerans* et d`autres Mycobactéries de l`environnement ; Kr : enzyme de synthèse de la mycolactone toxine retrouvée chez *Mycobacterium ulcerans* et d`autres MPM. ; (-) : Résultat négatif au profil recherché ; (+) : Résultat positif au profil recherché

- **Typage moléculaire par MIRU-VNTR**

Toutes les souches isolées dans cette étude ont été typées par l`utilisation des 4 Miru-VNTR : MIRU1, VNTR19, LOCUS 6 et ST1. Parmi ces 4 marqueurs utilisés, le MIRU 1 a été la séquence la plus amplifiée et le LOCUS 6 le moins amplifié. Le MIRU 1 a identifié 2 profils différents chez *M. smegmatis* représentés par 2 copies et 4 copies ; *M. immunogenicum* présentait également 2 profils différents représentés par 3 copies (486 pb) et 4 copies du Miru 1 ; *Mycobacterium sp* présentait 3 profils différents représentés par 1 copie (380 pb), 2 copies et 4 copies du Miru 1. *M. peregrinum* ne présentait qu'une seule copie du MIRU 1 (**Figure 11**). VNTR19 a permi d'identifier un seul profil représenté par 2 copies (340 pb) dans le genome des espèces *M. peregrinum, M. mucogenicum, Mycobacterium sp.* Le LOCUS 6 a permis d'identifier un seul profil (500 pb) chez l'espèce *M. mucogenicum* uniquement. ST1 a montré 2 profils dont une copie de 369 pb chez l'espèce *M. mucogenicum* et 2 copies de 423 pb chez l'espèce *M. peregrinum, Mycobacterium sp* (**Figure 12**). Le profil génétique des souches était déterminé à partir du nombre de repétition des 4 différents loci sur le genome de la bactérie (**Tableau X**). Ces marqueurs génétiques étant recommandés dans la littérature pour disciminer *M. ulcerans* des autres MPM (**Stragier *et al.*, 2005** ; **Lavender *et al.*, 2008**).

- L'identification moléculaire des souches de Mycobactéries a démontré la présence de la séquence IS2404 ; et le gène de la Kétoreductase codant pour la toxine initialement retrouvée chez *Mycobacterium ulcerans* au niveau des souches *M. peregrinum)*; *M. mucogenicum* ; *Mycobacterium* sp. et *M. smegmatis.*

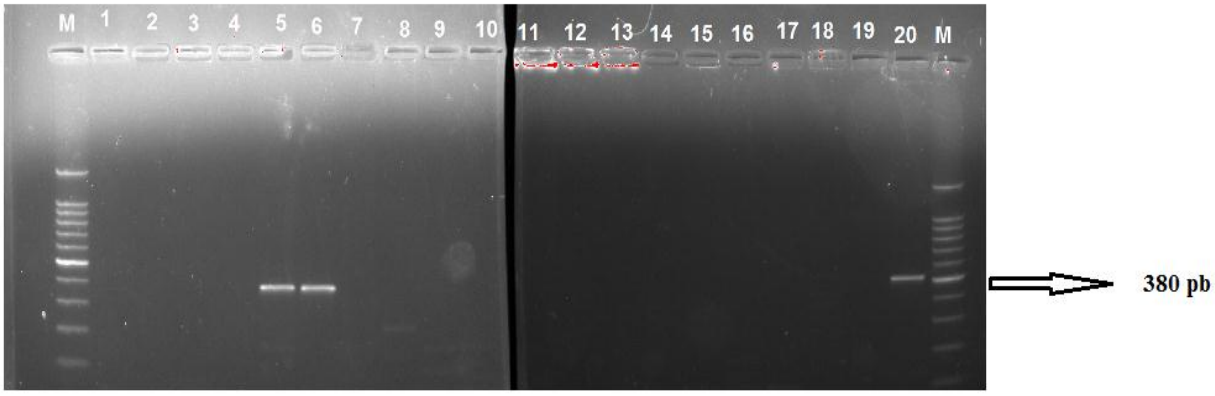


Figure 11 : Electrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant 0.5 µg/ml de BET des produits d'amplification par *MIRU 1* à partir de souches bactériennes.

Piste M : marqueur de poids moléculaire SmartLadder 10000 pb; pistes 1 à 18 : ADN de souches obtenus après culture ; piste 19 : contrôle négatif ; piste 20 : contrôle positif 181 UB15

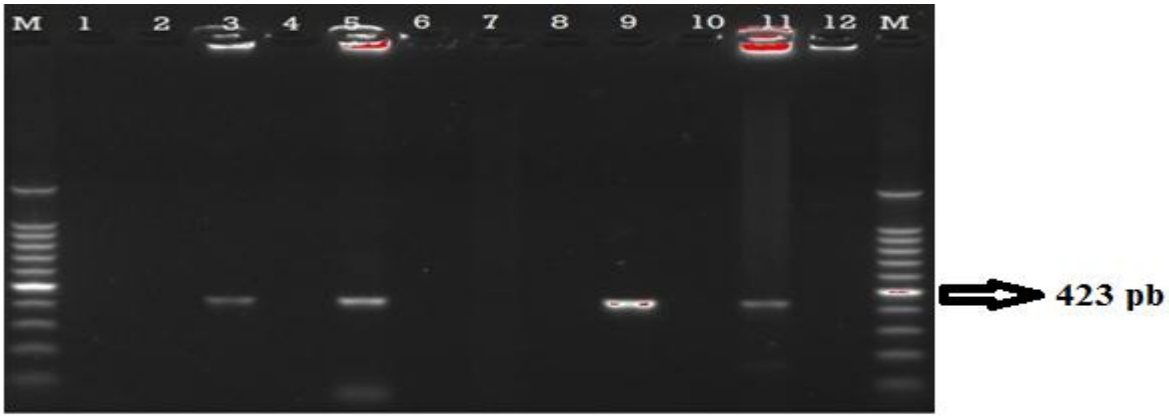


Figure 12 : Electrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant 0.5 µg/ml de BET des produits d'amplification par *ST1* à partir de souches bactériennes.

Piste M : marqueur de poids moléculaire SmartLadder 10000 pb; pistes 1 à 12 : ADN de souches obtenus après culture.

Tableau X : Typage moléculaire des espèces de Mycobactéries identifiées par sites

Sites	Espèces de Mycobactéries	MIRU1	VNTR19	ST1	LOCUS 6	Profil VNTR
Adzopé	*M. smegmatis*	2	nd	nd	nd	nd
Adzopé	*M. peregrinum*	nd	nd	2	nd	nd
Adzopé	*M.mucogenicum*	4	nd	nd	nd	nd
Adzopé	*M. mucogenicum*	nd	2	nd	nd	nd
Adzopé	*M. mucogenicum*	nd	nd	1	nd	nd
Adzopé	*M. peregrinum*	nd	nd	nd	nd	nd
Abgoville	*Mycobacterium sp.*	nd	nd	nd	nd	nd
Abgoville	*M. smegmatis*	4	nd	nd	nd	nd
Abgoville	*M. immunogenicum*	3; 4	nd	nd	nd	nd
Aguien	*M. peregrinum*	nd	2	nd	nd	nd
Aguien	*Mycobacterium.sp*	nd	nd	2	nd	nd
Aguien	*Mycobacterium. Sp*	nd	2	2	nd	nd
Aguien	*M. peregrinum*	nd	2	nd	nd	nd
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	nd	nd	nd	nd	nd
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	nd	nd	nd	nd	nd
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	nd	nd	nd	nd	nd
Sokrogbo	*Mycobacterium. Sp*	nd	nd	nd	nd	nd
Bodo	*M. mucogenicum*	nd	nd	nd	nd	nd
Bodo	*M.mucogenicum*	nd	2	nd	1	nd
Adiopodoumé	*M. peregrinum*	1	nd	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	1 ; 2	nd	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	1	nd	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	nd	nd	2	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	nd	nd	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	4	nd	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium. Sp*	1	nd	nd	nd	nd

- nd : non déterminé ; Miru1 (1 copie ; 2 copies ; 3 copies ; 4 copies) ; VNTR 19 (2 copies) ; ST1 (1 copie ; 2 copies) ; LOCUS 6 (1 copie)

III-1-4 Paramètres physico-chimiques des sites

- **Température, Turbidité, Conductivité, pH**

Adzopé

La conductivité moyenne était de 38,43 µS/cm avec un minimum de 24,33 µS/cm en Août 2014 et un maximum de 49,48 µS/cm enregistré en Mai 2015. La valeur moyenne en chlore libre était de 5,71 mg/L. La concentration minimale (0,00 mg/L) a été mesurée en Juin 2014 et la maximale (36,23 mg/L) était au mois de septembre 2014. La valeur moyenne en nitrite était de 0,65 mg/L. La concentration minimale (0,02 mg/L) a été mesurée en Juin et juillet 2014 et la maximale (04,77 mg/L) était au mois d'Aout 2014. Sur le plan microbiologique, 6 espèces ont été identifiées à adzopé : *M. peregrinum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus, M. smegmatis, Mycobacterium sp*.

Agboville

La conductivité moyenne était de 42,06 µS/cm variant entre un minimum de 34,20 µS/cm en Mars 2015 et 60,75 µS/cm enregistré en Mai 2015. La valeur moyenne en chlore libre à Agboville était de 30,65 mg/L. La concentration minimale (0,00 mg/L) a été mesurée en Fevrier 2015 et la maximale (56 mg/L) était au mois de juillet 2015. La valeur moyenne en nitrite était de 10,64 mg/L. La concentration minimale (0,01 mg/L) a été mesurée en Juin 2014 et la maximale (28,85 mg/L) était au mois de Mai 2015. 4 espèces y ont été identifiées : *M. peregrinum, M. immunogenicum, M. smegmatis, Mycobacterium sp*.

Sokrogbo

La conductivité moyenne était de 51,56 µS/cm avec un minimum de 42,90 µS/cm en Mars 2015 et un maximum de 62,88 µS/cm enregistré en Octobre 2015. La valeur moyenne du Chlore libre était de 53,97 mg/L. La concentration minimale (37,25 mg/L) a été mesurée en Mars 2015 et la maximale (67 mg/L) était au mois d'Avril 2015. La valeur moyenne en nitrite était de 45,67 mg/L. La concentration minimale (30,7 mg/L) a été mesurée en Mars 2015 et la maximale (55,85 mg/L) était au mois d'Avril 2015. La valeur du nitrate était la plus élevée sur le site de Sokrogbo 1, à raison de 42 mg/L. La valeur du Fer y était de 200 mg/L 2 espèces y ont été identifiées : *M. peregrinum, Mycobacterium sp*.

Bodo

La conductivité moyenne était de 58,85 µS/cm avec un minimum de 40,45 µS/cm en Juin 2015 et un maximum de 76,5 µS/cm enregistré en Août 2015. La valeur moyenne en chlore libre à Bodo était de 54,23 mg/L. La concentration minimale (39,5 mg/L) a été mesurée en Juin 2015 et la maximale (81,7 mg/L) était au mois de Mai 2015. La valeur moyenne en nitrite était de 40,97 mg/L. La concentration minimale (32 mg/L) a été mesurée en Septembre 2015 et la maximale (46,42 mg/L) était au mois de Juillet 2015. Le site de Bodo présentait la plus forte concentration en Calcium, Fer et en Sulfate avec des valeurs moyennes de 50 mg/L, 200 mg/L et 270 mg/L respectivement. 3 espèces y ont été identifiées : *M. immunogenicum, M. mucogenicum, M. smegmatis.*

Lagune Aghien

La conductivité moyenne était de 75,82 µS/cm avec un minimum de 47,80 µS/cm en Septembre 2014 et un maximum de 113,32 µS/cm enregistré en Juin 2015. La valeur moyenne en chlore libre sur la Lagune Aghien était de 36,70 mg/L. La concentration minimale (9,46 mg/L) a été mesurée en Aout 2014 et la maximale (60,73 mg/L) était au mois de Février 2015. La valeur moyenne en nitrite était de 47,21 mg/L. La concentration minimale (0,19 mg/L) a été mesurée en Juillet 2014 et la maximale (171,62 mg/L) était au mois de Fevrier 2015. 3 espèces y ont été identifiées : *M. peregrinum, M. chelonae, Mycobacterium sp*.

Adiopodoumé

La conductivité moyenne était de 58,93 µS/cm avec un maximum de 81,80 µS/cm en Octobre 2015 et un minimum de 37,63 µS/cm enregistré en Septembre 2015. La valeur moyenne en Chlore libre à était de 58,15 mg/L. La concentration minimale (47,50 mg/L) a été mesurée en Mai 2015 et la maximale (68,93 mg/L) était au mois de Mars 2015. La valeur moyenne en nitrite à était de 45,65 mg/L. La concentration minimale (36,95 mg/L) a été mesurée en Mai 2015 et la maximale (56,70 mg/L) était au mois de Septembre 2015. 2 espèces y ont été identifiées : *M. peregrinum, Mycobacterium sp*.

Loka

La conductivité moyenne était de 80,12 µS/cm avec un maximum de 93 µS/cm en Septembre 2015 et un minimum de 64,4 µS/cm enregistré en Août 2015. La valeur moyenne en chlore libre à Loka était de 64,28 mg/L. La concentration minimale (33,50 mg/L) a été mesurée en Aout 2015 et la maximale (86,85 mg/L) était au mois de Septembre 2015. La valeur moyenne

en nitrite était de 48,98 mg/L. La concentration minimale (34,65 mg/L) a été mesurée en Août 2015 et la maximale (63,4 mg/L) était au mois de Septembre 2015. Aucune espèce n'a été identifié. Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques mesurés dans les eaux et dans les sédiments sont consignées dans le tableau XI et tableau XII (respectivement).

Tableau XI : Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques des eaux

Paramètres	SITES DE PRELEVEMENT							
	Adzopé (n = 45)	Adiopodoumé (n = 18)	Tiassalé			Bouaké (n = 6)	Agboville (n = 15)	Aghien (n =143)
			Sokrogbo 1 (n = 9)	Sokrogbo 2 (n = 9)	Bodo (n = 6)			
pH	7,08 ± 0,57	7,15±0,64	6,88±0,46	7,05±0,51	7,24±0,84	6,86±1,05	7,23± 0,72	7,62± 0,92
Température	26,60 ± 3,57	26,97±1,58	25,18±2,84	25,44±3,26	26,00± 1,26	25,83±0,75	25,39± 4,23	28,07± 2,57
Turbidité	19,36± 15,37	35,08±21,98	30,23±10,71	28,36±12,84	33,58±18,7	22,47±8,37	18,01± 7,12	32,27±31,53
Conductivité	38,01±11,00	60,61±18,35	44,63±11,20	53,98±16,30	54,04±16,33	79,25±20,74	42,61±9,91	71,42±21,30
Calcium	10,01±10,61	35,77±35,87	11,82±23,37	14,86±22,44	38,83±19,73	40,06±34,41	7,67±9,52	25,16±17,11
Magnésium	2,02± 4,58	23,08±8,85	19,62±12,84	15,00±13,57	29,73±12,02	21,78±4,21	13,99±17,90	18,04±25,85
Dureté Calcique	22,61± 25,62	52,24±17,83	41,56±21,56	46,29±12,00	30,84±14,91	44,65±15,21	22,20±22,72	27,20±24,08
Fer total	1,48± 2,34	197,77±111,89	149,50± 113,49	258,76±134,31	188,00±87,35	156,83±40,38	5,61±11,49	3,31±11,90
Chlore libre	3,95±11,74	65,38±22,91	49,93±21,68	42,78±13,69	50,9±18,54	66,28±25,74	25,03±27,90	23,11±14,94
Nitrate	12,60± 14,36	26,11±5,67	37,60±11,30	29,00±10,74	30,33±12,40	28,83±8,21	12,69±15,99	1,33±2,31
Nitrite	0,8± 2,18	49,62±17,23	38,84±10,87	41,07±8,00	43,14±9,09	52,52±19,90	4,52± 5,35	3,51±26,60
Potassium	26,18±12,33	31,12±10,73	42,14±12,31	46,00±17,10	27,18±8,72	33,73±9,97	22,19±22,70	4,70±6,72
Sulfate	18,4± 24,71	33,28±6,97	89,88±117,65	108,36±127,54	226,25±105,62	37,00±6,66	33,80±41,01	2,57±16,86
Phosphate	20,32± 29,47	40,41±29,38	39,83±17,00	46,31±14,81	35,00±7,24	68,76±56,17	0,14±0,05	2,01±13,78
Manganèse	0,05± 0,24	49,02±21,35	44,71±19,07	39,38±19,43	37,00±19,76	47,26±8,36	0,00±0,00	0,23±2,11

Tableau XII : Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques des sédiments

Paramètres	SITES DE PRELEVEMENT							
			Tiassalé					
	Adzopé (n = 16)	Adiopodoumé (n = 18)	Sokrogbo 1 (n = 9)	Sokrogbo 2 (n = 9)	Bodo (n = 6)	Bouaké (n = 6)	Agboville (n = 15)	Aghien (n = 143)
pH	6,81±0,56	7,20±0,46	7,01±0,27	6,94± 0,29	7,10±0,73	7,08±0,79	7,31±0,85	7,58±3,23
Température	23,59 ± 2,09	26,72±2,02	27,04 ±2,32	26,30±1,68	25,50±2,59	26,83±1,17	26,93±2,11	27,23±1,57
Turbidité	30,36± 12,03	32,68±21,33	34,52±14,25	30,92±11,91	52,00±34,25	27,20±1,00	30,36±11,78	52,28±27,92
Conductivité	39,97 ± 9,24	57,26±21,47	60,21±13,11	47,40±14,88	60,17±16,51	81,00±16,92	41,51±11,57	81,21±47,55
Calcium	15,25±14,99	27,16±30,55	16,88 ±25,32	14,25±21,43	39,05±19,51	19,60±29,37	19,33±18,19	13,64±29,48
Magnésium	8,43± 11,58	20,31±2,74	18,33±12,22	21,86±14,79	35,07±12,04	22,70±3,76	33,88±19,15	19,38±23,49
Dureté Calcique	41,56 ± 35,58	54,03±12,79	42,00±19,69	53,33±21,60	28,74±14,30	56,10±19,65	39,68±14,37	34,38±14,39
Fer total	15,79±26,43	188,47± 81,27	223,71±142,49	133,59±109,60	187,00±87,09	189,53±77,13	40,39±53,08	68,37±32,97
Chlore libre	12,52±20,07	54,48±21,87	65,93±26,03	57,22±26,29	57,57±19,05	62,28±23,64	31,59±20,10	37,87±16,43
Nitrate	10,99±18,27	23,94 ±3,86	36,63±11,98	25,50±8,08	30,33±12,36	24,50±5,99	11,19±15,24	24,14±21,95
Nitrite	0,19±0,35	41,68±10,8	48,46±20,82	54,31±25,61	38,81±7,53	45,45±17,59	16,76±21,30	90,90±127,61
Potassium	25,43±12,22	31,74±10,31	40,92±15,99	37,82±9,06	27,25±8,68	29,67±10,73	37,13±11,27	26,18±26,80
Sulfate	33,61±66,60	36,42±6,53	113,76±125,63	99,07±109,74	213,82±92,36	29,09±5,92	152,99±211,01	148,67±85,46
Phosphate	40,13±52,72	51,22±44,80	44,60±16,45	40,87±13,11	36,50±3,73	28,00±5,76	52,39±51,65	111,65±54,08
Manganèse	0,02±0,09	49,13±15,02	39,82±16,01	36,40±16,92	37,33±19,55	51,80±25,52	60,69±160,11	22,51±29,37

Les distributions des différents parametres physico-chimiques sont décrites sous forme de graphique en annexes. L'analyse en composante principal (ACP) utilisé a permi la comparaison des moyennes de chaque paramètre. Tous les calculs statistiques ont été faits à l'aide du logiciel R. La corrélation entre les différents paramètres physico-chimiques n'est pas réellement significative (**Figure 13**).

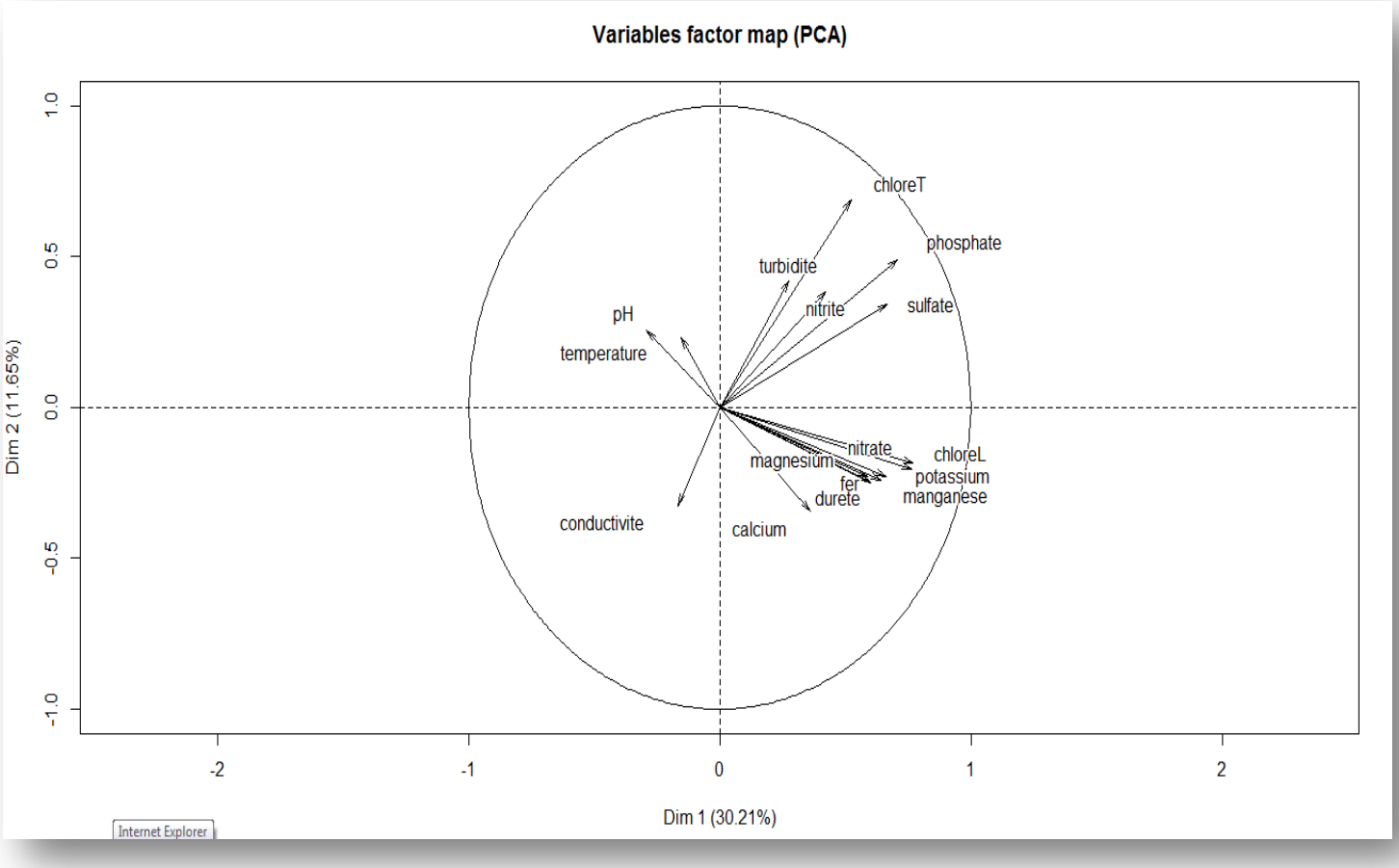


Figure 13 : Corrélation entre les différents Paramètres Physico-Chimiques

Dans cette analyse, La corrélation entre les différents paramètres physico-chimiques n'est pas réellement significative dans la plupart des cas étudiés. Cependant quelques cas rares tel que Le chlore total, le phosphate et le sulfate étaient corrélés positivement, ces éléments étaient tous indépendants du chlore libre, du potassium et du manganèse également corrélés positivement.

- ❖ Le niveau de conductivité, la quantité de nitrite, la quantité de chlore libre et le type d'échantillon sur les sites sont les quatres facteurs déterminants de la présence ou de l'absence des Mycobactéries sur un site. Ses quatres facteurs influencent sous différentes conditions :
- ➢ Lorsque la conductivité ($p < 0{,}001$) > 84, 10% de presence de Mycobactéries
- ➢ Lorsque la conductivité ($p < 0{,}001$) ≤ 84 et le nitrite ($p = 0{,}001$) > 98,5, absence de Mycobactéries
- ➢ Lorsque la Conductivité ($p < 0{,}001$) ≤ 84, le nitrite ($p = 0{,}001$) ≤ 98,5 et le chlore libre ($p < 0{,}001$) > 13,1, 60% de présence de Mycobactéries
- ➢ Lorsque la Conductivité ($p < 0{,}001$) ≤ 84, le nitrite ($p = 0{,}001$) ≤ 98,5, le chlore libre ($p < 0{,}001$) ≤ 13,1 additionnée au type d'échantillon (sédiments) ($p = 0{,}044$), 40% de présence de Mycobactéries

Les quatres facteurs sont disposés sous forme d'un arbre de décision grace au logiciel R (**Figure 14**).

En fonction des proportions d`échantillons contenant les Mycobactéries par site, Bodo était le site le plus propice dans la prolifération des Mycobactéries avec 50% de présence (**Figure 15**).

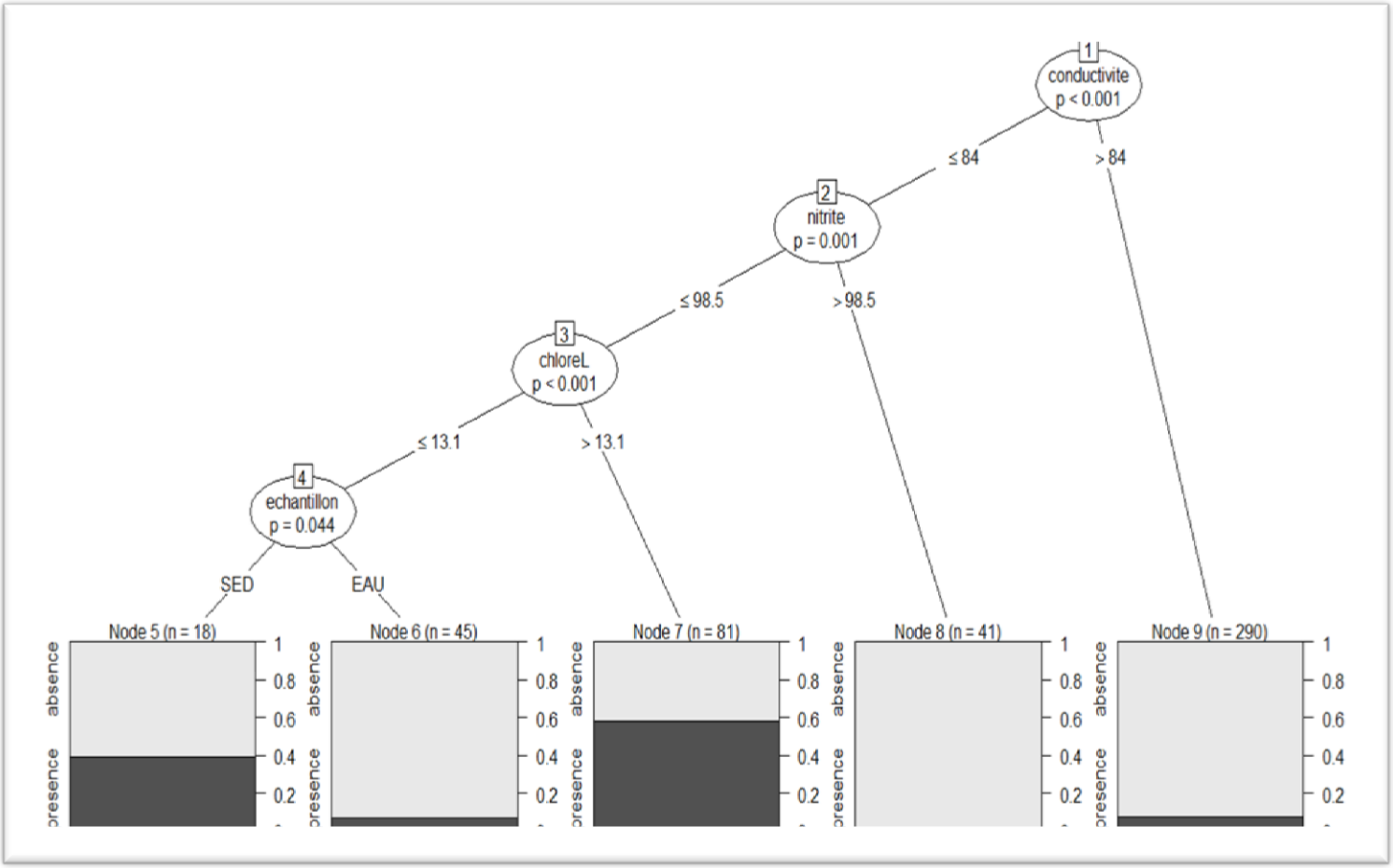


Figure 14 : Paramètres Physico-Chimiques influençant le développement des Mycobactéries

Legende : Absence de Mycobactéries Présence de Mycobactéries

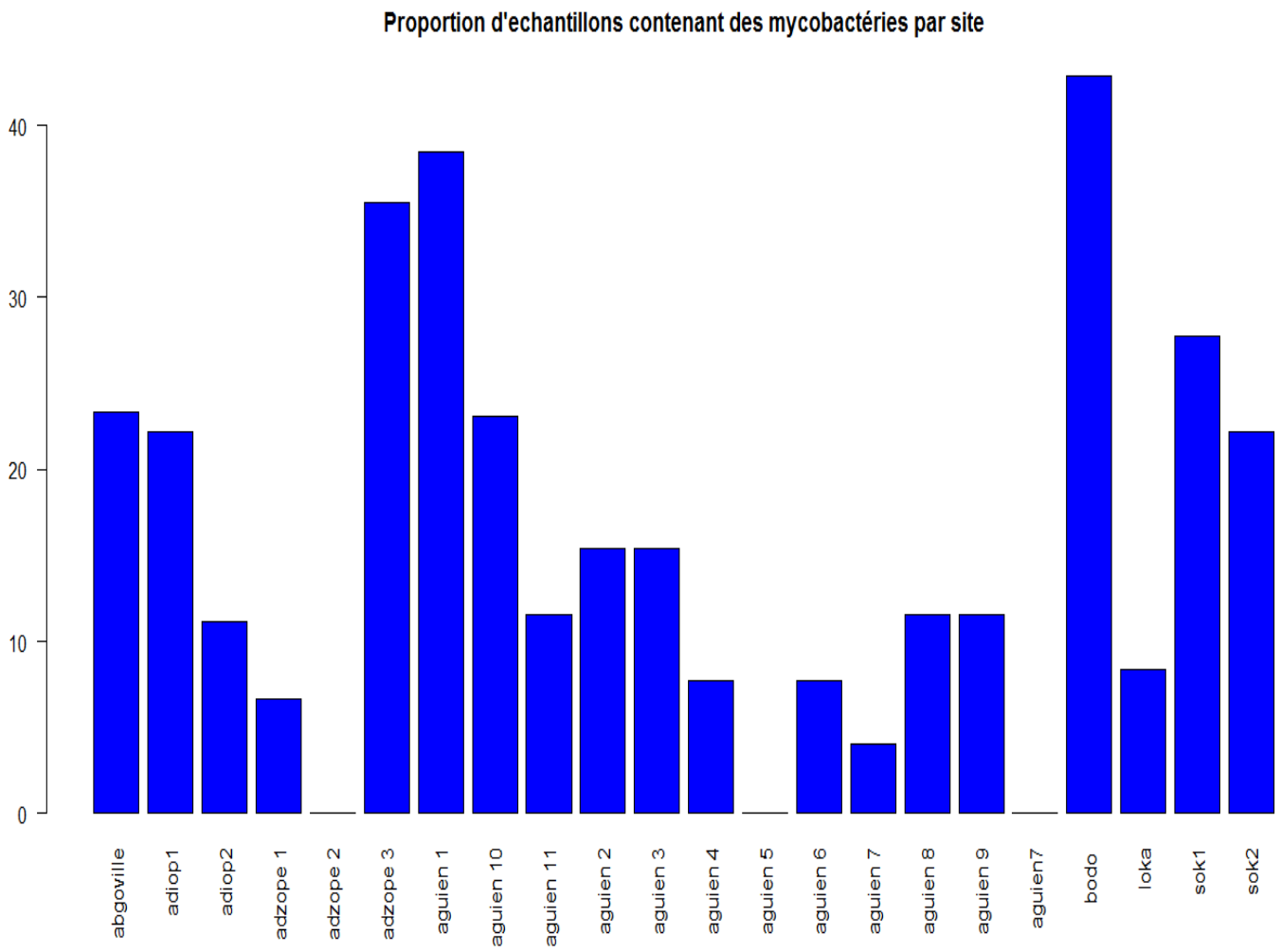


Figure 15 : Représentation du site le plus propice à la prolifération des Mycobactéries

Points de prelevement

III-2 DISCUSSION

Identification microbiologique des Mycobactéries environnementales

La présente étude a été entreprise afin d'identifier les espèces de Mycobactéries dans l'eau et les sédiments prélevés de différents sites et de déterminer celles qui sont porteuses des gènes de virulence attribués à *Mycobacterium ulcerans*, en Côte d'Ivoire.

Les sites choisis dans cette étude étaient les sites considérés comme endémiques par le Programme national de l'Ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Ceci sur la base de la présence dans ces dernièrs d'au moins un cas notifié d'Ulcère de Buruli. Ce sont : Adiopodoumé, Tiassalé, Adzopé, Agboville, Bouaké, Aghien. En effet, l'endémicité de l'Ulcère de Buruli, causé par *Mycobacterium ulcerans*, en Côte d'Ivoire est très élevée avec une prévalence de 16 % retrouvée dans certains villages **(Marston *et al.*, 1995)**. Le mode de transmission est jusqu'à nos jours inconnu. Neanmoins, l'environnement serait impliqué dans la transmission de cette pathologie. Cependant, selon les données, *Mycobacterium ulcerans* ne serait pas la seule mycobactérie impliquée dans les ulcérations, plusieurs mycobactéries seraient ainsi incriminées. Elles seraient largement distribuées, sous forme libre, dans l'environnement hydro-tellurique (eau, terre, végétaux) dans lequel elles sont capables de survivre et de multiplier. Dans ce travail, 473 échantillons d`eaux et de sédiments ont été prélevés et analysés selon l'objectif visé. Au Total, 29 souches (44,61 %) ont été identifiées dans l'eau contre 36 (55,38%) dans les sédiments. Les sédiments étaient les plus contaminés par les Mycobactéries avec 55,38% de présence contre 44,61% pour les échantillons d'eau. D'une manière générale, cette étude confirme la présence des Mycobactéries sur tous les sites choisis. D`autres études menées par Mohammad et *al.* (**2010**) ont prouvé que le taux d`isolement des Mycobactéries dans l`eau était plus faible que dans les sols. Cela s`expliquerait par la présence dans les sédiments d`une forte présence de paramètres favorables à la croissance des Mycobactéries (**Kirschner et *al.*, 1992**). En effet, l'importance de la densité des Mycobactéries dans les sédiments serait expliquée par une forte présence de matières organiques, une forte humidité, une forte concentration en acide humique et fulvique (**Kirschner et *al.*, 1992 ; Randomski et *al.*, 2010 ; Mohammad et *al.*, 2010**). Selon une étude faite par Marston *et al.* **(1992)**, la prévalence locale de l'Ulcère de Buruli en Cote d'Ivoire serait de 16,3%. Dans la présente étude, le taux de prévalence des Mycobactéries environnementales était de 13,74%. Notre étude pourrait expliquer ce taux élévé de l'Ulcère de Buruli en Cote d'Ivoire. Néanmoins, ce taux est relativement inférieur au 15,5% observé par Kankya *et al.* (**2011**) en Ouganda contre 18,2% observé par Mohammad et *al.* (**2010**) en

Iran. Cette différence pourrait s'expliquer par l`utilisation de décontaminants différents avec des effets variables sur la croissance des Mycobactéries (**Stinear et *al.*, 2007**). En effet, il existe plusieurs méthodes de décontamination chez les Mycobactéries. Dans l`étude réalisée par Kamala et collaborateurs (**1994**), six méthodes de décontamination étaient comparées. La méthode la plus efficace est celle qui élimine les bactéries interférentes tout en conservant les Mycobactéries. Les étapes de concentration et de décontamination entraînent souvent la perte de Mycobactéries cultivables, et certains milieux de culture relativement sélectifs ne mettent pas en évidence certains organismes non cultivables. Ainsi Pickup *et al.* (**2005**) ont noté que plusieurs espèces de MNT dans la rivière Tall (GB) ne pouvaient être récupérées par la culture. Mohammad *et al*. **(2010)**, ont trouvé que le traitement avec 3% de SDS combiné à 1% de NaOH était le plus efficace pour isoler des Mycobactéries dans des échantillons de sols avec un taux de 18,3%. Dans notre étude, la méthode la mieux adaptée, était le CPC à 0,1% additionné au Tampon phosphate à 0,067 M pH 6,8. En effet, Le traitement au détergent chlorure de Cétylpyridium (CPC) stimule la croissance de nombreuses MNT avec des contaminations faibles en bactéries interférentes (**Stinear et *al.*, 2004**). Les Mycobactéries possèdent une résistance naturelle aux détergents tels que : le Chlorure de Cétylpyridium qui stimule la croissance de nombreuses MNT avec des contaminations faibles en bactéries interférentes (**Stinear *et al.*, 2004**). Le caractère non toxique du composé et de ses propriétés bactéricides en font un désinfectant exceptionnellement polyvalent et précieux. Il montre une grande puissance bactéricide contre une large variété d'organismes : les spores de *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Bacillus anthracis*, et *Bacillus subtilis*. Ce traitement réduit également la contamination et augmente le rendement des cultures (**Smithwick *et al.*, 1975 ; Selvakumar *et al.*, 1995**). Les espèces mycobactériennes n'ont pas la même résistance aux différentes procédures de décontamination (**Parashar et *al.*, 2004**). L'efficacité des décontaminants dépend de leur concentration et du temps de contact avec l`échantillon (**Hunter et *al.*, 2001**). Parashar et *al.* **(2004)** ont aussi remarqué la variation de l'efficacité des méthodes de décontamination en fonction de la provenance des échantillons.

Dans cette étude, 65 souches ont été isolées, elles étaient toutes des bacilles acido-alcoolo-résistantes (BAAR). Meme si elle est moins spécifique au genre *Mycobacterium,* Cette technique de coloration reste néanmoins la première étape d`identification des Mycobactéries **(Shinnick & Good, 1994)**. En effet, les mycobactéries sont capables de retenir la fuschine malgré l'action combinée de l'alcool et de l'acide. Les lipides présents en grande quantité sur

leur paroi sont responsables de cette acido-alcoolo resistance **(Murray, 1995)**. Afin de confirmer le genre *Mycobacterium,* une coloration de Gram a été réalisé sur les colonies identifiées BAAR positifs, aucune ne présentait une acido-alcoolo resistance facultative. Ce qui permet de confirmer l'absence des genres, moins décrits *Dietzia, Gordona* et *Tsukamurella* qui sont des BAAR facultatifs (**Gangadharam & Jenkins, 1998a ; Prescott et *al.*, 2003 ; Euzéby, 2010**). L'identification de l`espèce nécessite ensuite des tests biochimiques complémentaires de croissance (**Euzéby, 2010**) en présence de certains composés, et de résistance à certains agents chimiques. Selon la classification de Runyon, toutes les Mycobactéries isolées appartenait au groupe des Mycobactéries à croissance rapide (Groupe IV), c'est-à-dire les Mycobactéries ayant une croissance à moins de 8 jours. En fonction de l`aspect des colonies, 87,69% des souches étaient lisse (Smooth (S)), contre 12,30% Rough (R) (rugueuses). Elles étaient en majorité des colonies dysgoniques. Nos résultats pourraient expliquer en partie la diversité au sein des espèces. L'étude de la production de pigment indique deux types de pigmentation au sein des souches isolées : des souches non pigmentées et des souches produisant un pigment à la lumière (souches photochromogènes). Aucune souche scotochromogène n'a été isolée dans cette étude. La photo-induction a permi d'identifier *Mycobacterium smegmatis* qui est la seule mycobactérie qui présentait une pigmentation jaune à la lumière dans cette étude. Toutes les mycobactéries présentaient une catalase thermostable à 22°C et 68°C. Au total, 7 espèces ont été identifiés. La croissance sur gélose ordinaire à 30 °C a permis d'identifier les espèces *M. peregrinum, M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus, Mycobacterium sp*. La croissance en présence 5% de chlorure de sodium (NaCl) a permis de différencier ces espèces. Cette technique a mis en évidence les Mycobactéries (**NaCl +**) (halotolérantes) qui sont : *M. peregrinum, M. abscessus* et les Mycobactéries (**NaCl -**) non halotolérantes qui sont : *M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, Mycobacterium sp.* Le test qui s'en est suivi était la Croissance sur milieu Mannitol permettant de différencier l'espèce *M. peregrinum* **Mannitol (+)** et l'espèce *M. abscessus* **Mannitol (-)**. Chez les Mycobactéries non halotolérantes, les espèces différenciées étaient *M. mucogenicum* **Mannitol (+),** *M. immunogenicum, M. chelonae, Mycobacterium sp* **Mannitol (-).** La croissance sur milieu Citrate de Simmons (CS) a différencié l'espèce *M. chelonae* ***CS* (+)**, l'espèce *M. immunogenicum,* **CS (-)** et *Mycobacterium sp* **CS *(-)*.** L`espèce *M. peregrinum* (13,84%) et *Mycobacterium sp.* (56,9%) ont été les plus fréquentes au niveau de tous les sites. *M. mucogenicum* etait l'espèce prédominante à Bodo, *M. peregrinum* prédominait à Adzopé. *M. peregrinum* fait partie du complexe *Fortuitum,* elles sont fréquemment retrouvées dans

l'environnement (**Kusunoki & Ezaki, 1992**). En effet, Tsukamura *et al.* (**1984**) ont trouvé que *M. fortuitum* était l`espèce la plus fréquente dans les échantillons de sols. Toutes ces espèces identifiées en Côte d`Ivoire seraient cause d`ulcérations cutanées dans certains pays selon la littérature **(Sniezek et *al.*, 2003** ; **Griffith et *al.*, 2007),** en Zambie certaines infections diverses seraient provoquées par *M. lentiflavum* et *M. intracellulare* (**Buijtels & Petit, 2005**). Les espèces responsables des mycobactérioses les plus fréquentes varient selon les zones géographiques. Dans les pays développés, *M. avium* est prédominante chez les patients à sérologie VIH négative ou positive. Cependant chez les sujets immunocompétents, d'autres espèces sont fréquemment isolées ; leur distribution est variable suivant les pays. En Grande Bretagne et en Europe du Nord, *M. malmoense* est retrouvé majoritairement (**Hoffner, 1994**). La répartition géographique des cas d'infections à *M. kansasii* est disparate : par exemple, aux Etats-Unis, les infections pulmonaires sont plus souvent rapportées dans certains états (Californie, Texas, Louisiane, Illinois et Floride) (**O'brien et *al.*, 1987**) et en Europe, notamment en Grande-Bretagne, dans les régions de charbonnage. Au Japon, peu d'infections sont rapportées : avant 1978 elles n'étaient rencontrées qu'à Tokyo et dans ses environs. Actuellement, elles sont observées dans tout l'Ouest du Japon, avec une faible incidence dans le Nord (**Raskine et *al.*, 1997 ; Tsukamura et *al.*, 1988**). Ainsi, d'un pays à l'autre et d'un continent à l'autre, l'épidémiologie des MNT diffère. Ces faits peuvent être expliqués par la présence dans ces milieux de conditions favorables à leur croissance.

Analyse physico-chimique

Corrélation entre les différents paramètres physico-chimiques

Bien que les variations dues aux difficultés des techniques d'isolement des Mycobactéries introduisent un biais dans l'interprétation des résultats, il a été montré que la distribution et la concentration des Mycobactéries atypiques dans l'environnement hydrique varient selon les régions et le type d'échantillon **(Falkinham et *al.*, 1980 ; Haas et *al.*, 1983 ; Iivanainen et *al.*, 1993 ; Kazda 1973$_1$; Kazda 1973$_2$; Kirchner et *al.*, 1992**). Les effets de quelques paramètres physico-chimiques sur ces microorganismes ont été étudiés afin de mieux comprendre leur répartition géographique et leur diversité.

Les pH moyens des plans d'eau étudiés séparément étaient compris entre 6-8 avec une conductivité assez faible en moyenne, qui était de 65,52 µs/cm pour l'ensemble des plans d'eau. La température mesurée dans les différentes stations a donné une moyenne globale de 27,05 °C, la turbidité moyenne était de 36,64 NTU sur tous les sites. Hormis la température, les eaux de la Lagune Aghien, du seuil d'Agboville et de la retenue d'Adzopé ont respecté les

normes de qualité des eaux brutes si l'on se réfère aux critères Français édités en 2007 (**Anonyme, 2007**). Cette norme considère le niveau de température dépassant les 25°C comme de mauvaise qualité. Cependant, vu les conditions climatiques en région tropicale où se situent ces plans d'eau, elle ne peut s'appliquer.

Corrélation entre les facteurs physico-chimiques des sites et l'occurrence des Mycobactéries

La variation de pH, ainsi que de la turbidité des échantillons d'eaux dans les sites n'était pas en corrélation avec la présence des Mycobactéries comme le décrivent les travaux de Falkinham, (**2009**) et de Norby *et al.* ***(*2007).** Dans cette étude, aucune correlation significative n'a été trouvé entre les différents paramètres. Cependant, quelques liens significatifs ont été trouvés entre le Chlore Total, le phosphate et sulfate ainsi que entre le Chlore libre, le potassium, le Manganèse. Le site de Bodo présentait la plus forte concentration en Calcium, Fer et en Sulfate avec des valeurs moyennes de 50 mg/L, 200 mg/L et 270 mg/L respectivement. Ces paramètres pourraient favoriser la présence des Mycobactéries sur le site **(Randomski et al., 2010**). La valeur du nitrate était la plus élevée sur le site de Sokrogbo 1, à raison de 42 mg/L. Les quatres facteurs déterminant la présence ou l'absence des Mycobactéries sur un site étaient : Le niveau de conductivité, la quantité de nitrite, la quantité de chlore libre. Ces facteurs associés au type d'échantillon favorisaient la prolifération des Mycobactéries sur les sites. Ainsi, avec la conductivité ($p < 0{,}001$) ≤ 84, le nitrite ($p = 0{,}001$) $\leq 98{,}5$ et le chlore libre ($p < 0{,}001$) $> 13{,}1$, 60% de présence de Mycobactéries ont été détectés. Ces conditions physico-chimiques étaient observées sur tous les sites étudiés sauf à Adzopé. Lorsque la conductivité ($p < 0{,}001$) ≤ 84, le nitrite ($p = 0{,}001$) $\leq 98{,}5$, le chlore libre ($p < 0{,}001$) $\leq 13{,}1$ additionnée au type d'échantillon (sédiments) ($p = 0{,}044$), 40% de présence de Mycobactéries. Ces conditions physico-chimiques étaient observées uniquement à Adzopé.

En fonction du type d'échantillon, le sédiment était l'échantillon le plus propice aux Mycobactéries, celui-ci agissaient en synergie avec d'autres paramètres cités précedemment. Ces résultats sont en contradictions avec les résultats de Iivanainen *et al.,* (**1993**) qui suggéraient que les concentrations en fer, aluminium, cuivre, cobalt, chrome influençaient la croissance des Mycobactéries dans les eaux de rivières (**Iivanainen *et al.,* 1993**). Egalement, Une autre étude focalisant sur les sols d'élevage bovins a indiqué que les cultures positives des espèces *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. asiaticum* et *M. abscessus*, étaient significativement associées avec des valeurs faibles du pH, des concentrations en calcium

faibles, et des concentrations fortes en fer, zinc et manganèse. Ainsi, cette étude confirme l'importance du chlore dans le développement des Mycobactéries (**Norton *et al.*, 2004 ; Steed & Falkinham, 2006)**. Certains paramètres cités dans la littérature tels que la teneur élevé en fer, un pH faible n'ont eu aucune influence significative sur la prolifération des mycobactéries contrairement à l'étude faite par Randomski *et al.* (**2010**). D'autres facteurs environnementaux tels que les différentes saisons, la présence de la matière organique non pris en compte dans cette étude pourraient expliquer ce resultat. En fonction des proportions d`échantillons contenant des Mycobactéries par site, Bodo était le site le plus propice dans la prolifération des Mycobactéries avec 50% de présence, les échantillons prélevés au niveau des sites d'Adzopé et d'Aghien étaient très pauvre en Mycobactéries.

Identification moléculaire des Mycobactéries environnementales

Grâce aux approches moléculaires, de nouvelles espèces de Mycobactéries ont été identifiés et la classification au sein des Mycobactéries est en constant remaniement. *M. ulcerans* est une des Mycobactéries à croissance lente dont la culture est souvent prise à défaut. La découverte en 1997 de la séquence d´insertion IS*2404* à l`origine, spécifique de *M. ulcerans* a été un catalyseur pour poursuivre la recherche du germe dans l´environnement **(Ross *et al.*, 1997)**. Cependant, elle partage cette séquence avec d'autres Mycobactéries de l´environnement comme *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium liflandii* et *Mycobacterium pseudoshottsii* **(Chemlal *et al.*, 2002 ; Stragier *et al.*, 2006).** Ces Mycobactéries à croissance lente seraient également responsables d'ulcération cutanée (**Stragier *et al.*, 2006**). Cette séquence est retrouvée en plus de 200 copies sur le génome de *M. ulcerans* **(Ross *et al.*, 1997 ; (Stinear *et al.*, 2007)**. Elle représente donc une cible de choix pour le diagnostic de l´Ulcère du Buruli **(Portaels *et al.*, 2009)** et pourrait l'être aussi pour les ulcérations cutanées à Mycobactéries. Dans cette étude, 20% des souches isolées était porteurs du gène IS2404 notamment les espèces *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium peregrinum* et *Mycobacterium* sp. Ceci laisserait supposer d'une part que ces Mycobactéries seraient apparentées à *M. ulcerans*, et d'autre part qu'elles pourraient avoir la capacité de provoquer des ulcérations cutanées. Elles seraient impliquées dans des ulcérations cutanées à travers le monde (**Gomez-Moyano et *al.*, 2009 ; Ishii et *al.*, 1998).** Les sites de Bodo et d'Adzopé sont connus pour leur endémicité aux ulcérations cutanées attribuées à tort ou à raison à *Mycobacterium ulcerans* selon le Programme national de lutte contre l`Ulcère de Buruli**.** Cette étude serait donc la première à mettre en évidence l'existence du gène IS2404 chez les Mycobactéries à croissance rapide car selon les études antérieurs, la séquence IS2404 était l'apanage des

Mycobactéries à croissance lente **(Chemlal *et al.,* 2002 ; Stragier *et al.,* 2006)**. D'autres études sont nécessaires pour éclaicir le lien existant entre ces espèces à croissance rapide et *Mycobacterium ulcerans*. Les ulcérations de l`Ulcère de Buruli sont causées par une toxine, la mycolactone (**George *et al.,* 1998**). Un plasmide de 174 pb (pMUM001) présent dans le génome de la bactérie porterait les gènes de la Polykétide Synthétase (PKS), responsable de la synthèse de celle-ci **(Stinear *et al.,* 2004 ; 2007)**. Elle a été identifié chez d`autres Mycobactéries environnementales à croissance lente appelées à cet effet, Mycobactéries productrices de mycolactone (MPM) (**Pidot *et al.,* 2010**). Les résultats de cette étude prouvent aussi son existence chez les Mycobactéries à croissance rapide. En effet, 9,23% des souches isolées abrite le gène de la Ketoreductase (Kr), l'une des enzymes de synthèse de la mycolactone, toxine de *M. ulcerans* (**Bali *et al.,* 2006**). En effet, cette enzyme permettrait de confirmer la présence du plasmide dans le génome de la bactérie (**Aka et *al.,* 2015**). D'autres études devraient etre réalisé afin de comprendre le lien existant entre ces Mycobactéries à croissance rapide et le plasmide retrouvé chez *M. ulcerans*, puisque la virulence de celle-ci est essentiellement liée à la présence de la mycolactone. Concernant le typage moléculaire des souches, parmi les 4 marqueurs spécifiques utilisés, le MIRU 1 est la séquence la plus amplifiée, et le LOCUS 6 le moins amplifié. Le MIRU 1 a identifié 2 profils différents chez *M. smegmatis* représentés par 2 copies et 4 copies ; *M. immunogenicum* présentait également 2 profils différents représentés par 3 copies (486 pb) et 4 copies du Miru 1 ; *Mycobacterium sp* présentait 3 profils différents représentés par 1 copie (380 pb), 2 copies et 4 copies du Miru 1. *M. peregrinum* ne présentait qu'une seule copie du MIRU 1. VNTR19 a permis d'identifier un seul profil représenté par 2 copies (340 pb) dans le genome des espèces *M. peregrinum, M. mucogenicum, Mycobacterium sp.* Le LOCUS 6 a permis d'identifier un seul profil (500 pb) chez l'espèce *M. mucogenicum* uniquement. ST1 a montré 2 profils dont une copie de 369 pb chez l'espèce *M. mucogenicum* et 2 copies de 423 pb chez l'espèce *M. peregrinum, Mycobacterium sp.* Le profil génétique des souches était déterminé à partir du nombre de repétitions des 4 différents loci sur le genome de la bactérie. Les résultats démontrent une diversité au sein des espèces de Mycobactéries isolées. Grâce au MIRU-VNTR, plusieurs profils ont été découvert, les profils A, B, C entre les souches de *M. ulcerans* et les profils D, E, F pour les souches de MPM **(Williamson *et al.,* 2008)**. Aucun profil connu n`a été identifié dans cette étude. Lavender *et al.* (**2008**) ont démontré l'importance des VNTR dans la discrimination entre les espèces de Mycobactéries productrices de mycolactone et *M. ulcerans* à partir d'échantillons environnementaux et clinique. Ces marqueurs seraient moins adaptées aux souches environnementales, puisqu`ils

ont été testés uniquement sur des échantillons environnementaux et des souches cliniques (**Stinear et *al.*, 2007 ; Williamson *et al.*, 2008**). Il serait interessant de tester d'autres marqueurs plus spécifiques afin de discriminer les souches entre elles.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Cette étude expérimentale avait pour objectif de caractériser les Mycobactéries environnementales potentiellement pathogènes isolées dans des zones à risques d'Ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. Elle a été réalisée sur des échantillons d'eaux et de sédiments provenant de différents sites écologiques du Sud et du Centre de la Côte d'Ivoire. Les techniques de bactériologie classique (culture, tests biochimiques) ont été utilisées pour l'identification des isolats. Les tests de typage moléculaire ont servi à discriminer les souches. Le dosage des nutriments a été effectué par photométrie, spectrophotométrie et colorimétrie respectivement dans l'eau et dans les sédiments.

Au terme de notre étude et sur la base des hypothèses, les résultats obtenus ont montré que :

- Des Mycobactéries non tuberculeuses à croissance rapide : *M. chelonae, M. abscessus, M. mucogenicum, M. immunogenum, M. smegmatis, M. peregrinum et Mycobacterium sp* ont été isolées tant dans l'eau que dans les sédiments.
- Les données moléculaires démontrent que *M. peregrinum* ; *M. mucogenicum ; M. smegmatis* et *Mycobacterium sp.* hébergent la séquence IS2404 et l'un des gènes de virulence initialement retrouvés chez *Mycobacterium ulcerans.*
- Les marqueurs de génotypage MIRU VNTR utilisés ne sont pas discriminants pour les souches isolées.
- Des paramètres ont été identifiés comme impliqués dans le développement des Mycobactéries notamment la conductivité, le nitrate et le chlore libre.
- Ces paramètres en association avec le type d'échantillon notamment le sédiment favorisent la prolifération des Mycobactéries dans l'environnement.
- La présence de ces facteurs a ainsi permis d'identifier plus de mycobactéries dans les sédiments que dans l'eau.

Cette étude permet en outre d'émettre d'autres hypothèses sur les étiologies des ulcérations chroniques cutanées dans ces zones. Ces Mycobactéries isolées potentiellement pathogènes auraient un impact non négligeable sur la morbidité et la mortalité chez l'homme. Cette étude permet d'envisager les recommandations et les perspectives suivantes :

RECOMMANDATIONS,

Au Ministère de la Santé,

- Renforcer le diagnostic étiologique des ulcérations chroniques cutanées en Côte d'Ivoire.
- Initier un système de veille microbiologique des Mycobactéries dans l'eau et les sédiments au niveau des différents sites étudiés.

Au Centre National de Référence Buruli à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire,

- Améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic de *M. ulcerans* et les autres Mycobactéries environnementales.
- Améliorer les méthodes de transport et de conservation des échantillons cliniques jusqu'à leur acheminement au laboratoire.

PERSPECTIVES

- Réaliser le séquençage des souches de Mycobactéries isolées dans cette étude notamment *Mycobacterium* sp. ; Mycobactéries (IS2404 +); (Kr +).
- Conduire une étude in vivo visant à l'évaluation du pouvoir pathogène des souches de Mycobactéries isolées.
- Caractériser et établir le lien entre les souches de Mycobactéries d'origine environnementale et clinique.
- Insérer d´autres jeux de marqueurs ayant un pouvoir de discrimination plus fin.
- Réaliser une étude quantitative des Mycobactéries dans l'eau de distribution.

REFERENCES

Appelgren P, Farnebo F, Dotevall L, Studahl M, Jönsson B, Petrini B & Lateonset, 2008 -Posttraumatic skin and soft-tissue infections caused by rapid-growing mycobacteria in tsunami survivors. *Clin Infect Dis,* 47:e6-11.

Ablordey A, Kotlowski R, Swings J & Portaels F, 2005a - PCR amplification with primers based on IS2404 and GC-rich repeated sequence reveals polymorphism in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol,* 43:448-450.

Ablordey A, Swings J, Hubans C, Chemlal K, Locht C & Portaels F, 2005b - Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium ulcerans. J Clin Microbiol,* 43: 1546-1551.

Adékambi T & Drancourt M, 2004a- Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp*65, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Intern J System Evol Microbiol,* 54 : 2095-2105.

Adekambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D & Drancourt M, 2004b - Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol,* 42: 5493-501.

Adekambi T, Berger P, Raoult D & Drancourt M, 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. *Int J Syst Evol Microbiol,* 56: 133-43.

Adékambi T, Salah SB, Khlif M, Raoult D & Drancourt M, 2006b- Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *App Environ Microbiol,* 72 : 5974-5981.

Adon MP, 2013- Variations spatiale et saisonnière du phytoplancton de la retenue d'eau d'adzopé : composition, structure, biomasse et production primaire. *Thèse Unique de l'Université Nangui Abrogoua,* Côte d'Ivoire.

AFNOR NF EN ISO 15586, 2004 - Qualité de l'eau - Dosage des éléments traces par spectrométrie d'absorption atomique en four graphite. Indice de classement T90-119.

Aka n'guetta, Kakou Solange, Coulibaly D, Vakou S, Kouadio K, Aoussi S, Kadio MC, Kouakou H, Ake J, N'guessan R & Dosso M, 2015- Virulence factors expressed by *Mycobacterium ulcerans* strains: Results of a descriptive study *Afr J Microbiol Res,* 9 :1745-1751.

Alavi MR, Shukla HD, Whitaker B, Arnold J & Shahamat M, 2007 - Attachment and biofilm formation of *Mycobacterium marinum* on a hydrophobic surface at the air interface. *World J Microbiol & Biotech,* 23 : 293-101.

Álvarez J, Gómez García I, Aranaz A, Bezos J, Romero B, L de Juan, 2008- Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: Molecular characterization for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol,* 46 : 1246-1251.

Ambrosio SR, Oliveira EMD & Rodriguez CAR, 2008 - Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Braz J Microbiol,* 39: 241-244.

American Thoracic Society, 1997- Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med,* 156 : S1-25.

Aminot A & Chaussepied M, 1983- Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, *Editions J Paris,* 8 : 395 p.

Anargyros P, Astill DSJ & Lim ISL, 1990 - Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol,* 28 : 1288-1291.

Andréjak C, Thomsen V & Johansen IS, 2010 - Nontuberculous pulmonary mycobacteriosis in Denmark: incidence and prognostic factors *Am J Respir Crit Care Med,* 181 : 514-521

Anonyme : SANP0720201A, 2007- Arrêté du 11 janvier 2007, relatif aux limites et références de la qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R 1321-2, R.1321-3, R.1321-38 du code de la santé publique.

Anonyme, 2009- Bilan d'activité du PNLUB-CI, 15 pages.

Arianna De Toni, Aurélie Touron-Bodilis & France Wallet, 2009 - Effet du changement climatique sur les micro-organismes aquatiques pathogènes : quelques exemples, 8 : 311-321.

Bali S & Weissman KJ, 2006- "Ketoreduction in Mycolactone Biosynthesis: Insight into Substrate Specificity and Stereocontrol from Studies of Discrete Ketoreductase Domains in vitro". *Chem BioChem,* 7 :1935-1942.

Bange FC & Böttger E, 2002- Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis. *European J Clin Microbiol Infect Diseases,* 21: 546-548.

Bange FC, Kirschner P & Böttger EC, 1999 - Recovery of mycobacteria from patients withcystic fibrosis. *J Clin Microbiol,* 37 : 3761-3763.

Barksdale L & Kim KS, 1977-Mycobacterium. *Bacteriol Rev,* 41 : 217-372.

Bartmann K, Meissner G, Schmiedel A & Nelles A, 1975- Biometrie der mykobakterien. Mycobakterien and mykobacterielle Krankheiten. Eds. Jena, in *VEB Gustav Fischer*. III**:** 19-58.

Baulard A, Kremer L & Locht C, 1996 - Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *J Bacterio,* 178 : 3091-3098.

Ben-Dov E, Shapiro OH, Siboni N & Kushmaro A, 2006 - Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *App Environ Microbiol,* 72 : 6902-6906.

Benowitz AB, Fidanze S, Small PL & Kishi Y, 2001 - Stereochemistry of the core structure of the mycolactones. *J Am Chem Soc,* 123 : 5128-5129.

Belghiti L, Chahlaoui A, Bengoumi D & EL Moustaine R, 2014 -Effect of anthropic activities on the quality of subsoil waters in rural medium in the area of Meknes *Larhyss J*, n°17, 77-89.

Ben Salah I, Cayrou C, Raoult D & Drancourt M, 2009 -*Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Intern J System Evol Microbiol,* 59 : 2803-2808.

Bercovier H, Kafri O & Sela S, 1986 - Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem Biophys Research Communications,* 136 : 1136-1141.

Bi Tié Albert Goula, Zilé Alex Kouadio, Koffi Eugène Kouakou, Yao Alexis N'go, Claude N'doume & Issiaka Savane, 2009 - Simulation du comportement hydrologique du bassin versant de l'agneby, en Cote d'Ivoire, *Rev Ivoir Sci Technol,* 13 : 91-113.

Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF & Guilloteau LA, 2005 - Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Res,* 36 : 411-436.

Bland CS, Ireland JM, Lozano E, Alvarez ME & Primm TP, 2005 - Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *A Environ Microbiol,* 71: 5719-5727.

Blackwood KS, He C, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J & Kabani AM, 2000 - Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol,* 38: 2846-2852.

Bloom BR & Murray CJL, 1992- Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Sc,* 257: 1055-1064

Brettle RP, 1997- *Mycobacterium avium intracellulare* infection in patients with HIV or AIDS *J Antimicrob Chemother,* 40: 156-160.

Britton LJ & Gresson PE, 1987- Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples, chapter A4 in techniques of water resources investigations of the United States Geological Survey, USGS, 79-1279,1979.

Brou T, Broutin H, Elguero E, Asse H & Guegan JF, 2008- Landscape diversity related to Buruli Ulcer disease in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis*, 30 ; 2 :271.

Brunello F, Favari F & Fontana R, 1999 - Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *J Clin Microbiol,* 37 : 1206-1209.

Bull TJ, Shanson DC & Archard LC, 1995 - Rapid identification of mycobacteria from AIDS patients by capillary electrophoretic profiling of amplified SOD gene. *Clin Molec Path,* 48 : M124-M132.

Buhler V & Pollack B 1953- Human infection with atypical acid-fast organisms: report two cases with pathologic findings. *Am J clin Pathol,* 23: 363-374.

Buijtels PCAM & Petit PLC, 2005 - Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Microbiol Meth,* 62 : 83-88.

Butler WR, Ahearn DG & Kilburn JO, 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.

Butler WR & Kilburn JO, 1990- High performance liquid chromatography patterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum,* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Clin Microbiol,* 28 : 2094-2098.

Butler WR, Jost KC & Kilburn JO, 1991- Identification of mycobacteria by highperformance liquid chromatography. *J Clin Microbiol,* 29 : 2468-2472.

Butler W R, Thibert L & Kilburn JO, 1992 - Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by highperformance liquid chromatography. *J Clin Microbiol,* 30 : 2698-2704.

Cage & GD, 1994 - Direct identification of *Mycobacterium* species in BACTEC 7H12B medium by High-Performance Liquid Chromatography. *J Clin Microbiol,* 32 : 521-524.

Cai L, Chen X, Zhao T, Ding BC & Zhang JZ, 2006 - Identification of *Mycobacterium marinum* 65 kD heat shock protein gene by polymerase chain reaction restriction analysis from lesions of swimming pool granuloma. *Chinese Med J,* 119 : 43-48.

Carbonnelle B, Thorel B, Manceau AL, Foui B & Carpentier E, 1996- Nouvelle technique de détection des Mycobactéries: Utilisation de l'automate Bactec 9240 TB *Rev Franç Laboratoires,* 1 : 125-128.

Carbonelle B, Dailloux M, Lebrun L, Maugein J & Pernot C, 2003 -Mycobactéries. *Mycobact Bioforma* 29.

Caroline Demangel, Timothy PS & Stewart TC, 2009- Buruli ulcer : reductive evolution enhances pathogenicity of *Mycobacterium ulcerans Mac Publish Limit,* Volume 10.

Carson LA, Petersen NJ, Favero MS & Aguero SM, 1978 - Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to desinfectants. *App environ Microbiol,* 36 :839-46.

Carson LA, Cusick LB, Bland LA & Favero MS, 1988 - Efficacy of chemical dosing methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers. *App Environ Microbiol,* 54 : 1756-1760.

Caruso G, Passàli FM, Salerni L, Molinaro G & Messina M., 2009 - Head and neck mycobacterial infections in pediatric patients. *Intern J Ped Otorhinol,* 73 : 38-41.

Chai N, Deforges L, Sougakoff W, Truffot Pernot C, De Luze A & Demeneix B, 2006 - *Mycobacterium szulgai* infection in a captive population of African clawed frogs (*Xenopus Tropicalis*). *J Zoo Wildlife Med,* 37: 55-58.

Chan J, Halachev M, Yates E, Smith G & Pallen M, 2012 - Whole-genome sequence of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus strain* 47J26. *J Bacteriol,* 194, 549.

Chapman JS & Bernard JS, 1962 -The tolerances of unclassified mycobacteria. I. Limits of pH tolerance. *Am Rev Respir Dis,* 86 : 582-3.

Che D, 2008 - Les cas de tuberculose maladie déclarés en France en 2006. *Bul épidémio hebdo,* 10 : 69-76.

Chemlal K, de Ridder KPA, Fonteyne W, Meyers M, Swings J & Portaels F, 2001- The use of IS2404 restriction fragment length polymorphisms suggests the diversity of *Mycobacterium ulcerans* from different geographic areas. *Am J Trop Med Hyg,* 64 : 270-273.

Chemlal K, Huys G, Laval F, Vincent V, Savage C, Gutierrez C, Laneelle MA, Swings J, Meyers WM, Daffe M & Portaels F, 2002- Characterization of an unusual *Mycobacterium*: a possible missing link between *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol,* 40 :2370-2380.

Cheunoy W, Prammanananb T, Chaipraserta A & Foongladda S, 2005 - Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: Two amplified targets, *hsp*65 and *rpo*B, for identification of cultured mycobacteria. *Dign Microbiol and Infectious Disease,* 51 : 165-171.

Chilima BZ, Clark IM, Floyd S, Fine PE & Hirsch PR, 2006 - Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi. *App Environ Microbiol,* 72 : 2343-2350.

Choi GE, Cho YJ, Koh WJ, Chun J, Cho SN & Shin SJ, 2012 - Draft genome sequence of *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii BD*(T). *J Bacteriol,* 194 : 2756-7

Choo SW, Wong YL, Tan JL, Ong CS, Wong GJ, Ng KP & Ngeow YF, 2012a - Annotated Genome Sequence of *Mycobacterium massiliense* Strain M154, Belonging to the Recently Created Taxon *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* comb. nov. *J Bacteriol,* 194, 4778.

Choo SW, Wong YL, Yusoff AM, Leong ML, Wong GJ, Ong CS, Ng KP & Ngeow YF, 2012b - Genome sequence of the *Mycobacterium abscessus strain M93. J Bacteriol,* 194, 3278.

Clark-Curtiss JE, 1990- Genome structure of mycobacteria. J. *McFadden Eds.* in *Academ Press,* 77-98

Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS & Bermudez LE, 1997- Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infct Immun,* 65 : 3759- 3767.

Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, 2002 - Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol,* 40 : 400-406.

Clovice K, Adrian M, Berit D, Musso M, John OA, Eystein S, James O, Vigdis E & Tone BJ, 2011- Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: *BMC Public Health,* 11:1471-2458.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C & Harris D, 1998 - Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* for the complete genome sequence. *Nat Austral,* 44 : 393-537.

Collins MT, Kenefick KB, Sockett DC, Lambrecht RS, McDonald J & Jorgensen JB, 1990- Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J Clin Microbiol,* 28 : 2514-2519.

Conville PS, Andrews JW & Witebsky FG, 1995 - Effect of PANTA on growth of *Mycobacterium kansasii* in BACTEC 12B medium. *J Clin Microbiol,* 33: 2012-2013.

Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R & Kabani A, 2003 - Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: Cost analysis. *J Clin Microbiol,* 41: 1010- 1015.

Cooper AM, Appelberg R & Orme IM, 1998- Immunopathogenesis of. *Mycobacterium avium* infection. *Front Biosci,* 3:141-148.

Corbett EL, Churchyard GJ, Clayton T, 1999 - Risk factors for pulmonary mycobacterial disease in south African gold miners. A case-control study *Am J Respir Crit Care Med* , 159 : 94-99.

Coulibaly N'golo AM-DG, 2010- L'Ulcère du Buruli en Côte d'Ivoire : Epidémiologie moléculaire et mode de transmission, Thèse Unique Doctorat de Biologie Humaine tropical, Côte d'Ivoire.

Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL & Stelma GNJr, 1999 - Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol,* 65:2492-2496.

Cuttino JT & Mc Cabe AM, 1949 - Pure granulomatous nocardiosis: A new fungus disease distinguished by intracellular parasitism. *Amer J Clin Path,* 25 : 1-34.

Da Costa Cruz JC, 1938- *Mycobacterium fortuitum* um novo bacillo acidoresistance pathogenico para o homen. *Acta Med,* 1: 297-301.

Dai J, Chen Y & Lauzardo M, 2011- Web accessible database of *hsp*65 sequences from *Mycobacterium* references strain. *J Clin Microbiol,* 49 : 2296-303.

Dailloux M, Laurain C, Weber M & Hartemann P 1999 - Water and nontuberculous mycobacteria. *Wat Res,* 33 : 2219-2228.

Dailloux M, Abalain ML & Laurain C, 2006- Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients *Eur Respir J,* 28 : 1211-1215.

Dailloux M, Laurain C, Weber R & Hartemann P, 2010 - Water and non tuberculous mycobacteria. *Wat Res,* 33:2219-2228.

Damsker B & Bottone EJ, 1985 - *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from the intestinal tracts of patients with aquired immunodeficiency syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis. *J Infct Dis,* 151: 179-181.

Dauendorffer JN, Guillemin I, Aubry A, Truffot-Pernot C, Sougakoff W & Jarlier V, 2003 - Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance determining regions of DNA gyrase genes. *J Clin Microbiol,* 41 : 1311-1315.

David H & Levy-Frabault V, 1986 - Méthodes de laboratoires pour mycobactériologie clinique. Supplément à « Mycobactériologie clinique: Diagnostic et Santé publique» *Manuel de la S.E.M. Institut Pasteur.*

David H, Levy-Frebault V & Thorel F, 1989- Recherche des Mycobactéries par examen au microscope. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Unité de la tuberculose et des Mycobactéries, In Pasteur (ed.), Paris. p. 21-28.

Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Scott JT, Dramaix M & Portaels F, 2004b - *Mycobacterium ulcerans* disease: role of age and gender in incidence and morbidity. *Trop Med Int Health,* 9: 1297-1304.

De Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E & Aranaz A, 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. *App Environ Microbiol,* 72 : 5927-5932.

Del Rio Camacho G, Soriano Guillén L, Flandes Aldeyturriaga J, Hernández García B & Bernácer Borja M., 2010 - Endobronchial atypical mycobacteria in an immunocompetent child. *Ped Pulmonol,* 45 : 511-513.

Denis F, Ploy MC, Martin C, Binger E & Quentin R, 2007 -"Bactériologie médicale : techniques usuelles." *E Masson Ed*., 2eme édition.

Doannio JMC, Konan KL, Dosso FN, Koné AB, Konan YL, Sankaré Y, Ekaza E, Coulibaly ND, Odéhouri KP, Dosso M, Sess ED, Marsollier L & Aubry J, 2009 - *Micronecta sp* (Corixidae) et *Diplonychus* sp (Belostomatidae), deux hémiptères aquatiques hôtes et/ou vecteurs potentiels de *Mycobacterium ulcerans* agent pathogène de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire.

Donaghy JA, Totton NL & Rowe MT, 2003 - Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Letters App Microbiol,* 37: 285-291.

Doffinger R, Patel SY & Kumararatne DS, 2006 -Host genetic factors and mycobacterial infections: lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity. *Microbes Infect,* 8: 1141-50.

Domenech P, Menendez MC & Garcia MJ, 1994 - Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiol letters,* 116 : 19-24.

Domenech P, Jimenez MS, Menendez MC, Bull TJ, Samper S & Manrique A, 1997 - *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Intern J System Bacteriol,* 47 : 535- 540.

Doucet-Populaire F, Lalandeb V, Carpentierc E, Bourgoind A, Dailloux M & Bolletf C, 1996 - A blind study of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Tubercle Lung Dis,* 77 : 358-362.

Draper P, 1971 - The walls of *Mycobacterium lepraemurium*: chemistry and ultrastructure. *J Gen Microbiol,* 69 : 313-324.

Drancourt M, Jarlier V & Raoult D, 2002 - The environmental pathogen *Mycobacterium ulcerans* grows in amphibian cells at low temperatures. *App Environ Microbiol,* 68 : 6403-6404.

Dubos RJ & Middlebrook G, 1947 -Media for tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc,* 56:334-345.

Duffey PS & Guthertz LS, 1992- *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* chromatotypes defined by curvilinear gradient HPLC of mycolic acids. *FEMS Microbiol Letters,* 95 : 27-36.

Duffey PS, Guthertz LS & Evans GC, 1996 - Improved rapid detection of mycobacteria by combining solid-phase extraction with highperformance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. *J Clin Microbiol,* 34 : 1939-1943.

El Khechine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D & Drancourt M, 2011- Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One* 6**,** e24720.

Euzéby JP, 2010 -Techniques de diagnostiques en mycobactériologie. *Dictionnaire de Bactériol Vétér*.

Ezold R, Sandow D, Neubert R & Stein HE, 1968 -Comparative studies on mersolat and sulfuric acid preparation of tissue, milk, feces and gastric juice with special reference to *Mycobacterium bovis*. *Zeitschrift Tuberkulose Erkrankungen Thoraxorgane,* 129: 157- 166.

Falkinham JO, Parker BC & Gruft H, 1980 -Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. I. Geographic distribution in the eastern United States. *Am Rev Respir Dis,* 121:931-937.

Falkinham JO, III 1996 - Epidemiology of infection by non-tuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev,* 9: 177-215.

Falkinham JO, III Norton CD & LeChevallier MW, 2001 - Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol,* 67**:** 1225-1231.

Falkinham JO, III 2002 - Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med,* 23, 529-551.

Falkinham JO, Nichols G, Bartram J, Dufour A & Portaels F 2004 -Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance. *Path mycobact in wat*, A guide to public health consequences, monitoring and management, 11p.

Falkinham JO, 2009- Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology,* 107: 356-367.

Felske A, Rheims H, Wolterink A, Stackebrandt E & Akkermans ADL, 1997 - Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiol,* 143: 2983-2989.

Felsenstein J, 1985 - Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol,* 39 : 783-791.

Ferdinand S, Legrand E, Seng Goh K, Berchel M, Mazzarelli G, Sola C, Tortoli E & Rastogi N, 2004 - Taxonomic and phylogenetic status of non-tuberculous mycobacteria in a Caribbean setting. *Molec Cell probes,* 18: 399-408.

Fidanze S, Song F, Szlosek-Pinaud M, Small PL & Kishi Y, 2001- Complete structure of the mycolactones. *J Am Chem Soc,* 123 :10117-10118.

Flageul B, 2009 - Situation et surveillance de la lèpre dans le monde, en France métropolitaine et d'outre-mer. *Institut de Veille Sanitaire, Dpmt Intern Trop,* 1-8.

Fogel GB, Collins CR, Li J & Brunk CF, 1999- Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb Eco,* 38 : 93-113.

Freney J, Renaud F, Leclercq R & Riegel P, 2007- "Précis de Bactériologie Clinique."

Fyfe JA, Lavender CJ, Johnson PD, Globan M, Sievers A, Azuolas J & Stinear TP, 2007- Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol,* 73 : 4733-4740.

Gangadharam PRJ & Jenkins PA, 1998a -Mycobacteria, basic aspects Eds. New York, in *Intern Thom Pub,* 1: 400.

George KL & Falkinham III JO, 1986- Selective medium for the isolation and enumeration of *Mycobacterium avium-intracellulare* and *M. scrofulaceum*. *Can J Microbiol,* 32:10-4.

George KL & Falkinham JO, 1989 -Aerosolization of mycobacteria. *Aerobiol H Environ,* 1 : 211-220.

George KM, Barker LP, Welty DM, Small PL, 1998- Partial purification and characterization of biological effects of a lipid toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun,* 66,587-593.

George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, 1999- Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Sc,* 283: 854-857.

George Amofah, Frank Bonsu, Christopher Tetteh, Jane Okrah, Kwame Asamoa, Kingsley Asiedu, & Jonathan Addy 2002 - Buruli Ulcer in Ghana: Results of a National Case Search *Emerg Infect Dis*, 8 : 167-170.

Gira A, Reisenauer AH, Hammock L, Nadiminti U, Macy JT, Reeves A, 2004- Furunculosis due to *Mycobacterium mageritense* associated with footbaths at a nail salon. *J Clin Microbiol*, 42 : 1813-1817.

Gomez-Moyano E, Del Boz Gonzalez J, Bermudez-Ruiz P & Sanz-Trelles A, **2009**- Furuncle-like lesions by *Mycobacterium mucogenicum* in a immunocompetent patient. *Med Clin (Barc)*, 132: 370.

Gomila M, Ramirez A & Lalucat J, 2007 - Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *App Environ Microbiol*, 73 : 3787-3797.

Gone DL, Gamagate B, Ligban R, Savane I & Biemi J, 2009- Characterisation of dissolved organic matte rat different stages of a tropical surface water treatment using fluorescence spectroscopy (Agboville, Côte d'Ivoire), *J Wat environ Techn*, Vol. 8, issue 1, 17-28.

Gonzalez-y-Merchand JA, Garcia MJ, Gonzalez-Rico S, Colston MJ & Cox RA 1997 - Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *J Bacteriol*, 179: 6949-6958.

Goodfellow M & Magee J, 1998- Taxonomy of mycobacteria. Mycobacteria basic aspects. *P. R. J. Gangadharam and P. A. J Eds*. in *Chapman and Hall*, 2: 1-71.

Goren MB, 1972 - Mycobacterial lipids: Selected topics. *Bacteriol Rev*, 36 : 33-64.

Griffith DE, Aksamit T & Brown-Elliott BA, 2007- Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *An official ATS/IDSA statement, Am J Respir Crit Care Med*, 175:367-416.

Griffith JF, Cao Y, McGee CD & Weisberg SB, 2009 - Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. *Water Res*, 43: 4900-4907.

Grosset J & Truffot-Pérnot CH, 1984 - Mise en évidence des Mycobactéries. In: *M Veron*: Annales de contrôle de qualité en bactériologie. Laboratoire National de la Santé. Paris.

Guthertz LS, Lim SD, Jang Y & Duffey PS, 1993- Curvilinear-gradient high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 31 : 1876-1881.

Guimaraes-Peres A, Portaels F, De Rijk P, Fissette K, Pattyn SR, Van Vooren J-P & Fonteyne P- A, 1999- Comparison of two PCRs for detection of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, 37 : 206- 208.

Guiral D & Ferhi A, 1989- Caractérisation ionique et isotopique d'un système hydrologique tropical : la lagune Ebrié (Côte d'Ivoire). Oceanologica Acta, 12 : 47-55.

Haas CN, Meyer MA & Palmer MS, 1983- The ecology of acid fast organisms in water supply, treatment and distribution systems. *J Amer Wat Assoc*, 75:139-144.

Hale YM., Pfyffer GE & Salfinger M, 2001- Laboratory diagnosis of Mycobacterial infections: New tools and lessons learned. *Clin Infect Dis*, 33: 834-846.

Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M & Deretic V , 2007- T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *M. Tuberculosis*. Immun, 27: 505-517.

Harzallah Besma, 2011- Etude de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD-Mémoire.

Heckert RA, Elankumaran S, Milani A & Baya A, 2001- Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. *J Clin Microbiol*, 39 : 710-715.

Heinz-Taheny KM, 2009 - Cardiovascular physiology and diseases of amphibians. *Veterinary Clin North Am Exotic Animal Pract*, 12 : 39-50.

Hilty M, Yeboah-Manu D, Boakye D, Mensah-Quainoo E, Rondini S, Schelling E, Ofori-Adjei D, Portaels F, Zinsstag J & Pluschke G, 2006- Genetic diversity in *Mycobacterium ulcerans* isolates from Ghana revealed by a newly identified locus containing a variable number of tandem repeats. *J Bacteriol*, 188:1462- 1465.

Hilborn ED, Covert TC, Yakrus MA, 2006 - Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl Environ Microbiol*, 72: 5864-5869

Hong H, Spencer JB, Porter JL, Leadlay PF & Stinear T, 2005a -A novel mycolactone from a clinical isolate of *Mycobacterium ulcerans* provides evidence for additional toxin heterogeneity as a result of specific changes in the modular polyketide synthase. *Chembiochem* 6, 643-648.

Hoffner SE, 1994 - Pulmonary infections caused by less frequently encountered slow growing environmental mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13:937-941.

Hoop RK, Böttger EC & Pfyffer GE, 1996 - Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. *J Clin Microbiol*, 34 : 991-992.

Hopewell PC & Bloom BR, 2000- Tuberculosis and other mycobacterial diseases. *Resp med J* F. Murray and J. A. Nadel Eds. Philadelphia, in *Saunders Company*.

Houngbédji MG, Boissinot M & Bergeron GM, 2008- Subcutaneous injection of *Mycobacterium ulcerans* causes necrosis, chronic inflammatory response and fibrosis in skeletal muscle. *Microbes Infect,* .10 : p. 1236-43.

Howard WL, Maresh F, Muller EE, Yanitelli SA. & Woodruff GF, 1949 - The role of pulmonary cavitation in the development of bacterial resistance to streptomycin. *Am Rev Tuber,* 59: 391

Horsburgh CR Jr , 1996 - Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin. Respir Infect,* 11: 244-251

Humbert JF, 2012- Rapport sur la mission : Lagune Aghien, p 25

Hunter P, Lee J, Nichol G, Rutter M, Surman S, Weldon L, Biegon D, Fazakerley T, Drobnewski F & Morrell P, 2001 - fate of *Mycobacterium avium* complex in drinking water and distribution system. Mallow, Buckinghamshire: *foundation for wat res*.

Ishii N, Sugita Y, Sato I & Nakajima H, 1998- A case of mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum* and *M. scrofulaceum*. *Acta Derm Venereol,* Jan ;78:76-77.

Inderlied CB, Kemper CA & Bermudez LM, 1993- The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev,* 6 : 266-310.

Iltis A & Levëque C, 1982- Caractéristiques physico-chimiques des rivières de Côte d'Ivoire. *In Rev Hydrobiol Trop,* vol. 15, 1982, no. 2, p. 115-130.

Jeyanathan M, Alexander DC, Turenne CY, Girard C & Behr MA, 2006 - Evaluation of in situ methods used to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in samples from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol,* 44 : 2942-2950.

Johne HA & Frothingham L, 1895- Ein eigentuentuenlicher fall von tuberkulose bein kinde. Dtsch Z. *Tier Med. Vergleich Pathol,* 21: 438-454

Johnson PDR, 2009- Correlation between Buruli ulcer and vector-borne notifiable diseases, Victoria, Australia. *Emerging Infect Dis,* 15, 614-615.

Jordaö Junior CM, Lopes FCM, David S, Farache Filho A & Leite CQF, 2009 -Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiol,* 26 : 658-661.

Kaal E, Kolk AHJ & Janssen HG, 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. *J Chromatography A,* 1216 : 6319-6325.

Kamala T, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P & Prabhakar R, 1994 - Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *App Environ Microbiol,* 60 : 1021-1024.

Kanga JM & Kacou D, 2000- Aspect épidémiologiques de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire : Résultats d'une enquête nationale. Manuscrit n°2193, *Santé Publique,* 5p.

Kanga JM & Kacou ED, 2005 -Aspects épidémiologiques de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire : résultats d'une enquête nationale. *Santé publique,* Manuscrit n° 2193.

Karlson AG & Feldman WH 1953 - Mycobacteria of human origin resembling *Mycobacterium avium,* Proceedings of the 15th *Intern Vet Congress,* P.159.

Kazda J, 1973$_1$ - The importance of water for the distribution of potentially pathogenic Mycobacteria. II. Growth of Mycobacteria in water models (author's transl). *Zentralbl Bakteriol* [orig B], 158:170-176.

Kazda J, 1973$_2$- The importance of water for the distribution of potentially pathogenic Mycobacteria. I. Possibilities for the multiplication of Mycobacteria (author's transl). *Zentralbl Bakteriol* [orig B], 158:161-169.

Kazda J, 2000- The ecology of mycobacteria. J. Kazda Eds. Dordrecht, Boston, London, in *Kluwer Academic Pub,* 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 *Spring,* 1**:** 1- 11.

Kazda J & Pavlik I, 2009- 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 *Spring,* 1**:** 13-19.

Kempsell KE, Ji YE , Estrada ICE, Colston MJ & Cox RA, 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. *J Gen Microbiol,* 138 : 1717-1727.

Kendall SL, Withers M, Soffair CN, Moreland NJ, Gurcha S & Sidders B, 2007 - A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Molec Microbiol,* 65 : 684- 699.

Kendall SL, Burgess P, Balhana R, Withers M, Bokum A ten & Lott JS, 2010 - Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: *kstR* and *kstR*2. *Microbiol,* 156 : 1362-1371.

Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ & Hugh-jones ME, 2000- *Mycobacterium ulcerans* multiple-locus variable number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within Bacillus anthracis. *J Bacteriol, 182:2928-2936.*

Khare S, Ficht TA, Santos RL, Romano J, Ficht AR & Zhang S, 2004 - Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separationconventional PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol,* 42 : 1075-1081.

Kiehn TE, Edwards FF, Brannon P & Tsang AY, 1985- Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests and morphological and seroagglutination characteristic. *J Clin Microbiol,* 121: 168-173.

Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, 1999 - Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpo*B). *J Clin Microbiol,* 37 : 1714- 1720.

Kimura M, 1980 - A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Molec Evo,* 16: 111-120.

Kirsch P, Nusser P, Hotzel H & Moser I, 2008 - *Mycobacterium gordonae* as potential cause of granulomatous lesions of the toe tips in the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Berl Münchener tierärztliche Wochenschrift,* 121: 270-277.

Kirschner RA, Parker BC & Falkinham JO, 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. *Am Rev Respir Dis,* 145:271-275.

Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A & Kiekenbeck M, 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.

Kirschner RA, Parker BC & Falkinham JO, 1999 - Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium. FEMS Microbiol Ecology,* 30 : 327-332.

Koffi Kouassi Guy Roger, 2007- Etude comparative de l'approvisionnement en eau potable de deux communautes en zone peri urbaine : cas du reseau sodeci (village d'adiopodoume km17) et du reseau autonome (site cnra-csrs) dans la commune de Yopougon-Abidjan. DESS en Génie sanitaire et environnement.

Koffi Konan JP, N'go Yao A, Yeo Kandana M, Koné D & Savané I, 2014- Détermination des périmètres de protection de la lagune Aghien par le calcul du temps detransfert de l'eau jusqu'a la lagune Septembre, pp. 19-35 *Larhyss J, 19- 19-35.*

Koroleff F, 1969 - Determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *ICES, C M C 9 Hydr Comm.*

Kubica GP, Kaufmann AJ & Dye WE, 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 Respiratory Dis,* 87 : 775-779.

Kubica GP & Dye WE, 1967- Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology. *PHS Publication,* No. 1547.

Kubica GP, Silcox VA, Kilburn JO, Smithwich RW, Beam RE & Jones WD, 1970- Differential identification of mycobacteria. VI. *Mycobacterium triviale* sp. nov. *Intern J System Bacteriol,* 20 : 161- 174.

Kubica GP, Baess I, Gordon RE, Jenkins PA, Kwapinski JB, Mc Durmont C, Pattyn SR, Saito H, Silcox V, Stanford JL, Takeya K. & Tsukamura M., 1972- A cooperative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. *J Gen Microbiol,* 73, 55-70.

Kunst H, Wickremasinghe M, Wells A & Wilson R, 2006 - Nontuberculous mycobacterial disease and *Aspergillus*-related lung disease in bronchiectasis. *Europ Respiratory J,* 28 : 352-357.

Kusunoki S & Ezaki T, 1992- Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov . *Intern J System Bacteriol,* 42: 240-245.

Lavender CJ, Stinear T, Johnson PDR, Azuolas J, Benbow ME, Wallace JR & Fyfe JAM. 2008- Evaluation of VNTR typing for the identification of *Mycobacterium ulcerans* in environnemental samples from Victoria, Australia. *FEMS Microbiol Lett,*. 287: 250-255.

Lavender CJ, Fyfe JAM, Azuolas J, Brown K, Evans RN, Ray LR & Johnson PDR, 2011- Risk of Buruli ulcer and detection of *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes in southeastern Australia. *PLoS Negl Trop Dis,* 5: 1305.

Leao SC, Tortoli E, Euzeby JP & Garcia MJ, 2011- Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as Mycobacterium abscessus subsp. bolletii comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus subsp. nov.* and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61: 2311-3.

Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S & Vincent V, 2002a - Chlorine disinfection of atypical Mycobacteria isolated from a water distribution system. *App Env Microbiol,* 68 : 1025- 1032.

Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S & Vincent V, 2002b - Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *App Env Microbiol,* 68 : 5318- 5325.

Lefmann M, Schweickert B, Buchholz P, Gobel UB, Ulrichs T & Seiler P, 2006- Evaluation of peptide nucleic acid-Fluorescence In Situ Hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *J Clin Microbiol,* 44 : 3760-3767.

Legrand E, C Sola & Rastogi N, 1999- Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* : Marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission interespèces. *Bul Soc path exo,* 93: 155-217.

Lehmann KB & Neuman RO, 1899a - Bakteriologische diagnostik. Verlg. L. F. Lehmanns Eds. München, in. 2 Auf: 408-413.

Lehtinen VA, Kaukonen T, Ikäheimo I, Mähönen SM, Koskela M & Ylipalosaari P 2005 - *Mycobacterium fortuitum* infection after a brown bear bite. *J Clinic Microbiol,* 43: 1009.

Lehtola MJ, Eila Torvinen, Miettinen IT & Keevil W, 2006 - Fluorescence In Situ Hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in potable-water biofilms. *App Environ Microbiol,* 72 : 848-853.

Leite CQF, Souza C & Leite SRA, 1998 - Identification of mycobacteria by Thin Layer Chromatographic Analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: Four years of experience. *Mem Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,* 93 : 801-805.

Leitritz L, Schubert S, Bücherl B, Masch A, Heesemann J & Roggenkamp A, 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. *J Clin Microbiol,* 39 : 3764-3767.

Leveque C, Dejoux C & Iltis A, 1983- Limnologie du fleuve Bandama, Cote d'Ivoire. *Hydrobiol,* 100 : 113-41.

Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Wattiau P, Top EM & Verstraete W, 2005 - Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Ecology,* 51 : 375-388.

Li L, Bannantine J, Zhang Q, Amonsin A, May B & Alt D, 2005 - The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Nation Ac Sciences USA,* 102 : 12344-13349.

Ilvananien EK, Martikainen PJ, Väänänen PK & Katila ML, 1993 - Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 398-404.

Linell F & Norden A 1954- *Mycobacterium balnei*, A new acid-fast bacillus occuring in swimming pools and capable of producing skin lesions in humans. *Act tubercul Scandinavica,* 33: 1-84.

Low N, Pfluger D & Agger M, 1997- Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in the Swiss HIV Cohort Study: increasing incidence, unchanged prognosis. *AIDS,* 11: 1165-1171.

Lumb R, Stapledon R, Scroop A, Bond P, Cunliffe D & Goodwin A, 2004 - Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. *App Environ Microbiol,* 70 : 4906-4910.

Mac Callum P, Tollhurst JC, Buckle G & Sissons HA 1948- A new mycobacterial infection in man. *J Path Bact,* 60: 93-101.

Macheras E, Roux AL, Bastian S, Leao SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Richter E, Rusch-Gerdes S, Pfyffer G, Bodmer T, Cambau E,Gaillard JL & Heym B, 2011- Multilocus sequence analysis and rpoB sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. *J Clin Microbiol,* 49: 491-9.

Mahon C R, Manuselis G & Lehman D C, 2007- Textbook of Diagnostic Microbiology. New York : WB Saunders Co.

Manfredi R, Nanetti A, Valentini R, Ferri M, Morelli S & Calza L, 2004 - Epidemiological, clinical and therapeutic features of AIDS-related Mycobacterium kansasii infection during the HIV pandémie *An II-year follow-up study. HIV Med, 5 :431-6.*

Marcela Rodriguez G & I Smith 2003 - Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: Role in physiology and virulence. *Molecular Microbiol,* 47 : 1485-1494.

Marras TK & Daley CL, 2002- Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med,* 23: 553-567.

Marri PR, Bannantine JP & Golding GB, 2006 - Comparative genomics ofmetabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decayand lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev,* 30 : 906-925.

Marion E, Prado S, Cano C, Babonneau J, Ghamrawi S, 2012- Photodegradation of the *Mycobacterium ulcerans* Toxin, Mycolactones : Considerations for Handling and Storage. *PLOS ONE* 7.

Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, Manceau AL, Mahaza C & Carbonnelle B, 2002- Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol,* 68 : 4623-4628.

Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint-Andre JP & Robert R, 2004 -Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *App Env Microbiol,* 70: 1097-1103.

Marsollier L, Sévérin T, Aubry J, Merritt RW, St André JP & Legras P, 2004a- Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *App Environ Microbiol,* 70 : 6296-6298.

Marsollier L, Stinear T, Aubry J, St André JP, Robert R & Legras P, 2004b -Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *App Env Microbiol,* 70 : 1097- 1103.

Martin-Casabona N, Bahrmand AR & Bennedsen J, 2004- Non tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey *Int J Tuberc Lung Dis,* 8 : 1186-1193

Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh R, Diomande 1, Saki MZ, Kanga JM, G'Bery P, Lipman HB, Ostroff SM & Good RC, 1995- Emergence of Buruli ulcer disease in Daloa region of Côte d'Ivoire. Am *J Trop Med Hyg,* 52: 219-24.

Marras TK & Daley CL, 2002- Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med,* 23 : 553-567

Maslow JN & Wallace R, 2002 - Outbreak of *Mycobacterium marinum* infection among captive snakes and bullfrogs. *Zoo Bio,* 21 : 233-241.

Maugein J, 2007- Identification moléculaire des Mycobactéries non tuberculeuses. *Rev Franco Lab,* 391.

Maugein J & Bauriaud R, 2009 - Recensement des mycobactérioses entre 2006 et 2008 par le réseau Azay Mycobactéries. 11ème journée de mycobacteriologie de langue française. Cbw. Bandol (France).

McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, 2004 - Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp*65) for routine

identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol,* 42 : 3000-3011.

Merritt RW, Walker ED, Small PLC, Wallace JR, Johnson PDR, Benbow ME & Boakye DA, 2010- Ecology and transmission of Buruli ulcer disease: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis,* 4: 911.

Mendum TA, Chilima BZ & Hirsch PR, 2000 - The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. *FEMS Microbiol letters,* 185: 189-192.

Menendez MC, Garcia MJ, Navarro MC, Gonzalez-y-Merchand JA, Rivera-Gutierrez S & Garcia-Sanchez L 2002- Characterization of an rRNA operon (rrnB) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species: Implications for the classification of mycobacteria.

Mediel M J, Rodriguez V, Codina G & Martin Casabona N, 2000 - Isolation of mycobacteria from frozen fish destined for human consumption. *App Environ Microbiol,* 66 : 3637-3638.

.

Medjahed H, Gaillard JL & Reyrat JM, 2010- *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol,* 18 **:**117-23.

Meyer L & David HL, 1979 - Mycobactériologie en Santé Publique. Publication du Centre National de Référence pour la Tuberculose et les Mycobactéries. Institut Pasteur Paris.

Mitchison A & Aber VR, 1974 -Culture of specimens other than sputum for Mycobacteria. *J Clin Path,* 27: 883-887.

Minnikin DE, 1982- Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. C. Ratledge and J. L. Stanford Eds. London, *in Ac Press,* 1: 95-184.

Minnikin DE, Lee OYC, Pitts M, Baird MS & Besra GS, 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". *JArcheol Sc,* 37: 2407-2412.

Miltner EC & Bermudez LE, 2000- *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoebacastellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicro Agents and Chemo,* 44 : 1990-1994

Middlebrook G & Cohn ML, 1958- Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am J Pub Health.,* 48 : 844-853.

Middlebrook G, Cohn ML, Dye WE, Russell WBJr & Levy D, 1960- Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand,* 38 : 66-81.

Moore M & Frerichs JB, 1953- An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *J Invest Dermatol* , 20 **:** 133-69.

Mohamed, AM, Abou El-Ella GA & EA Nasr, 2009 - Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. *J Veterinary Diagnostic Investigation*, 21 : 48-52.

Mohammad Rahbar, Aboulfath lamei, Homayoon Babazadeh & Shoherh Afshar yavari, 2010- Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in iran, *African J Biotechnol*, vol 9, pp. 3618-3621.

Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E & Garcia MJ, 2006- *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Intern J System Evol Microbiol*, 56 : 2049-2054.

Murray RGE, DJ Brenner, MP Bryant, JG Holt, NR Krieg & JW Mouldier, 1989- Bergey's manual of systematic and bacteriology. Eds. Baltimore, USA, in *Williams and Wilkins*. 2 **:** 1599.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC & Yolken RH, 1995- "Manual of Clinical Microbiology." *A Press, Ed*.

Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F & Small PLC, 2003- Heterogeneity of Mycolactone toxins produced by *Mycobacterium ulcerans*: Implications on virulence. *Infect Immun*, 71 : 774-783.

Mve-Obiang A, Lee RE, Umstot ES, Trott KA, Grammer TC, Parker JM, Ranger BS, Grainger R, Mahrous EA & Small PL, 2005- A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of Xenopus species with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the *Mycobacterium ulcerans* macrolide toxin. *Infect Immun*, 73:3307-3312.

Nichols G, Ford T, Bartram J, Dufour A & Portaels F, 2004 - Introduction In : Pedley S. *et al.* (eds), Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management. W H O, IWA Publishing, UK, p 2-14.

Nicolas Radomski, Emmanuelle Cambau, Laurent Moulin, Sophie Haenn, Regis Moilleron & Francoise S Lucas, 2010- Comparison of Culture Methods for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Surface Waters ; *App environ microbiol*, 76 : 3514-3520.

Nakanaga K, Ishii N, Suzuki K, Tanigawa K & Goto M 2007- "*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*" isolated from a skin ulcer lesion: identification based on 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*, 45: 3840-3843.

Narasimhan R, Mathur GP & Pamra SP, 1972- Sodium lauryl sulphate method of culturing sputum for *Mycobacterium tuberculosis*. *Ind J Tuberculosis,* XIX(4).

Neumann M, Schulze-Robbecke R, Hagenau C & Behringer K, 1997 - Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *App Environ Microbiol,* 63 : 547-552.

N'gohesse-Kouassi E, 2007- Caractérisation phytoplanctonique et bactériologique des eaux de la Lagune Aghien (Cote d'Ivoire). Mémoire de DEA, Université Abobo-Adjamé, Abidjan, p 60.

N'go YA, Goné DL, Savané I & Goblé MM, 2004- Potentialités en eaux souterraines des aquifères fissurés de la région d'Agboville (Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire): Caractérisation hydroclimatique et physique. Laboratoire « Géosciences et Environnement », Université d'Abobo-Adjamé, UFR Sciences et Gestion de l'Environnement, Côte d'Ivoire, 1 : 127 -144.

N'guessan KA, Konan KF, Bony KY, Edia OE, Gnagne T, Traore S & Houenou PV, 2011- Prospects for rehabilitation ofmanmade lake system of Yamoussoukro (Ivory Coast). *Procedia Environ Sc,* 9 : 140-147.

N'guessan KA, Kouassi Amani M, Gnaboa R, Traoré KS & Houenou PV, 2014- Analyse de phénomènes hydrologiques dans un bassin versant urbanisé: cas de la ville de Yamoussoukro (centre de la Côted'Ivoire), *Larhyss J,* 135-154.

Nieminen T, Pakarinen J, Tsitko I, Salkinoja-Salonen M, Breitenstein A & Ali-Vehmas T, 2006 - 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils. *J Microbiol Methods,* 67 : 44-55.

Ninet B, Monod M, Emler S, Pawlowski J, Metral C & Rohner P, 1996 - Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J Clinic Microbiol,* 34 : 2531-2536.

Niva M, Hernesmaa A, Haahtela K, SalkinojaSalonen M, Sivonen K & Haukka K, 2006- Actinobacteria communities of borel forest soil and lake water are rich in mycobacteria. *Boreal Environment Research,* 11 : 45-53.

Nolte F & Metchock B, 1995- *Mycobacterium*. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M A Pfaller, F. C. Tenoverand R.H. Yolken (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. *Am Soc Microbiol*,Washington, D.C. pp.400-437

Norby B, Fosgate GT, Manning EJB, Collins MT & Roussel AJ, 2007- Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: Association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Vet Microbiol,* 224 : 153-159.

Normes EN ISO 19458, 2006 -Qualité de l'eau -Echantillonnage pour analyse microbiologique.

Norton CD, LeChevallier MW & Falkinham JO, 2004 - Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water Res*, 38 : 1457-1466.

O'Brien RJ, Geiter LJ & Snider DE, 1987 - The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. *Am Rev Respir Dis*, 135: 1007-1014.

Oliveira RS, Sircili MP, Oliveira EMD, Balian SC, Ferreira-Neto JS & Lea SC, 2003 - Identification of *Mycobacterium avium* genotypes with distinctive traits by combination of IS*1245*- based Restriction Fragment Length Polymorphism and restriction analysis of hsp65. *J Clin Microbiol*, 41 : 44-49.

Olivia M, 2004- L'Ulcère de Buruli, la « maladie mystérieuse ». . http : www.afrik. com /7428.html

Organisation Mondiale de la Santé, 2001- Ulcère de Buruli. Diagnostic de l´infection à *Mycobacterium ulcerans*. Sous la direction de Françoise Portaels, Paul Johnson et Wayne M. Meyers (éd.) 92 pages.

Palomino JC & F Portaels, 1998 - Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *J Clin Microbiol* 36: 402-408.

Pamela Small laboratory, 2012- Methods for studying the transmission of *Mycobacterium ulcerans* from the environment to humans. University of Tennessee, Knoxville, USA, January, 6 : e1506.

Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SV & Katoch VM, 2004 - Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. *App Environ Microbiol*, 70: 3751-3753.

Park S, Suh GY & Chung MP, 2008 - Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens *Respir Med*, 102 : 437-442

Pavlik I, Dvorska L, Matlova L, Svastova P, Parmova I & Bazant J 2002 - Mycobacterial infections in cattle in the Czech Republic during 1990-1999. *Veterinary Med - Czech*, 47 : 241-250.

Perraudin ML, Herrault A & Desbois JC 1980 - Ulcère cutané à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli). *Annales de pédiatrie*, 27: 687-692.

Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A & Cotruvo JA, 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 *W H O titles with IWA Publishing*, 1: 1-229.

Pidot SJ, Asiedu K, Kaser M, Fyfe JAM & Stinear TP, 2010 - *Mycobacterium ulcerans* and Other Mycolactone-Producing Mycobacteria should be considered a single species, *PLoS Negl Trop Dis* 4, 7: e663.

Pickup RW, Rhodes G, Arnott S, Sidi-Boomedine K, Bull TJ, Weightman A, Hurley M & Hermon-Taylor J, 2005- *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl Environ Microbiol*, 71 : 2130-2139

Pilet Ch, Bourdon JL, Toma B, Marchal N & Balbastre C, 1979 - Bactériologie médicale et vétérinaire. *A. Obré & R. Buttiaux DO IN éditeurs Paris* 438p.

Pizzi R & J Miller, 2005 - Amputation of a *Mycobacterium marinum*-infected hindlimb in a African bullfrog (*Pyxicephalus adspersus*). *Veterinary Rec*, 156 : 747-748.

Portaels F & Pattyn SR, 1982- Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. *Ann Microbiol* 133B:213-21.

Portaels F, Realini L, L Bauwens, B Hirschel, Meyers WM & W de Meurichy, 1996 - Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium genavense* in birds kept in a zoo: 11-year survey. *J Clin Microbiol*, 34 : 319-323.

Portaels F, Agular J, Fissette K, Fonteyne PA, De Beenhouwer H, De Rijk P, Guédénon A, Lemans R, Stenou C, Zinsou C, Dumonceau JM. & Meyers MW 1997- Direct detection and identifcation of *Mycobacterium ulcerans* in clinical specimens by PCR and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. *J Clin Microbiol*, 35: 1097-1100.

Portaels F, Meyers WM, Ablordey A, Castro AG & Chemlal K, 2008- First Cultivation and Characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the Environment. *PLoS Negl Trop Dis*, 2 : 178.

Portaels F, Silva MT, Meyers WM , 2009- Buruli ulcer. *Clin Dermatol*, 27 : 291-305.

Prevot G, Marsollier L & Carbonelle B, 2004- Diagnostic de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* en Guyane française. Presse Médicale, 33 : 1516.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA, Bacq-Calberg CM & Dusart J, 2003- Les bactéries : Les Gram-positifs riches en G-C. *Microbiologie J Prescott, J Harley and D Klein* Eds Bruxelles, 1: 541.

Primm T, Lucero CA & Falkinham JO, 2004- Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 17 : 98-106.

Raffi F, Butler WR & Cerniglia CE, 1992- Differentiation of a rapidly growing, scotochromogenic, polycyclic-aromatichydrocarbonmetabolizing strain of *Mycobacterium* sp. from other known *Mycobacterium* species. *Archives Microbiol,* 157 : 512-520.

Ranger BS , Mahrous EA, Mosi L , Adusumilli S , Lee RE , Colorni A, Rhodes M & Small PL 2006- Globally distributed mycobacterial fish pathogens produce a novel plasmid-encoded toxic macrolide, mycolactone F. *Infect Immun*; 74 : 11: 6037-6045.

Radomski N, Thibault VC, Karoui C, K de Cruz, Cochard T & Gutiérrez C, 2010 - Genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins, studied by MIRUVNTR and IS*1311* RFLP typing methods. *J Clinic Microbiol,* 48 : 1026-1034.

Raskine L, Leleu S & Sanson-Lepors MJ, 1997- *Mycobacterium kansasii*: aspects cliniques et bactériologiques. *Feuil boil,* 38 : 33-42.

Rastogi N, Legrand E & Sola C, 2001- The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 20 : 21-54.

Ramakrishnan T, Suryanarayana M & Gopinathan KP, 1972- Intermediary metabolism of mycobacteria. *Bacteriol Rev,* 36 : 65-108.

Realini L, Van Der Stuyft P, De Ridder K, Hirschel B & Portaels F, 1997- Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. *J Clin Microbiol,* 35: 2791-2794.

Redman JE, Shawa MJ, Mallet AI, Santos AL, Roberts CA & Gernaey AM, 2009 - Mycocerosic acid biomarkers for the diagnosis of tuberculosis in the Coimbra Skeletal Collection. *Tuberc,* 89 : 267-277.

Reed C, Fordham von Reyn C, Chamblee S, Ellerbrock TV, Johnson JW & Marsh BJ, 2006 - Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. *American J Epidemiol,* 164 : 32-40.

Reischl U, Feldmann K, Naumann L, Gaugler BJ, Ninet B & Hirschel B, 1998b - 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.

Reisner BS, Gastson AM & Woods GL, 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. *J Clin Microbiol,* 32: 2995-2998.

Rhodes MW, Kator H, McNabb A, Deshayes C, Reyrat JM, Brown-Elliott BA, Wallace RJr, Trott KA, Parker JM, Lifland B, Osterhout G, Kaattari I, Reece K, Vogelbein W & Ottinger CA, 2005- *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (Morone saxatilis). *Int J Syst Evol Microbiol,* 55:1139-1147.

Rohr J Angew, 2000- A new role for polyketides *Int* Ed, 68: 2847-2849.

Richards WD & Thoen C, 1977- Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *American Soc Microbiol,* 6 : 392-395.

Richard kadio M , Dick R & Djeha D, 1990- les ulceres cutanées à mycobacteries atypiques et leur traitement par la chirurgie plastique. *Med Afr Noire*, 37: 276-82.

Richter E, Rüsch-Gerdes S & Hillemann D, 2006 - Evaluation of the GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol*, 44 : 1769-1775.

Ridderhof JC, Wallace RJ, Kilburn JO, Butler WR, Warren N & Wong ES, 1991 - Chronic tenosynovitis of the hand due to *Mycobacterium nonchromogenicum*: Use of highperformance liquid chromatography for identification of isolates. *Rev Infect Dis*, 13: 857-864.

Rigouts L, Nolasco O, de Rijk P, Nduwamahoro E, Van Deun A, Ramsay A, 2007 - Newly developed primers for comprehensive amplification of the *rpo*B gene and detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 45: 252-254.

Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, Gaillard JL & Pierre-Audigier C, 1999- hsp 65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 37: 852-7.

Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, Macheras E, Heym B, Herrmann JL, Daffe M, Brosch R, Risler JL & Gaillard JL, 2009- Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One,* 4: e5660.

Rodier J. Legube B. Merlet N., 2009- l'Analyse de l'eau. *Dunod*,1579.

Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, Stinear T, Hayman JA, Veitch MG & Robins-Browne RM, 1997- *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative diseases. *Appl Environ Microbiol*, 63: 4135-4138.

Roux AL, Herrmann JL, Gaillard JL & Rottman M, 2010- *Mycobacterium abscessus* : an emerging pulmonary pathogen. *Immuno-analyse Biologie spec*, 25: 26-33.

Ruiz-Manzano J, Manterola JM, Gamboa F, Calatrava A, Monsó E, Martínez C, 2008 - Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplification kits. *Chest*, 118 : 648-655.

Runyon EH, 1959 - Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin N Am*, 43:273-290

Saitou N & Nei M, 1987- The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecul Bio Evolution,* 4 : 406-425.

Sanchez-Chardi A, Olivares F, Byrd TF, Julian E, Brambilla C & Luquin M, 2011- Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol,* 49 **:** 2293-5.

Saleeb PG, Drake SK, Murray PR & Zelazny AM, 2011- Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol,* 49**:** 1790-4.

Salem JI, Carvalho CM, Ogusku MM, Maia R & Ruffino-Netto A, 2007- PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. *Act Amazonica,* 37 : 419-424.

Sarfo FS, Le Chevalier F, Aka N, Phillips RO & Amoako Y, 2011 - Mycolactone Diffuses into the Peripheral Blood of Buruli Ulcer Patients – Implications for Diagnosis and Disease Monitoring. *PLoS Negl Trop Dis,* 7: 1237.

Scheren PAGM, Kroeze C, Janssen FJJG, Hordijk L & Ptasinski KJ, 2004- Integrated water pollution assessment of the EbrieLagoon, Ivory Coast, West Africa, *J Marine Systems,* 44: 1-17.

Shinnick TM & Good RC, 1994- Mycobacterial taxonomy. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis,* 13 : 884- 901.

Schinsky MF, Morey RE, Steigerwalt AG, Douglas MP, Wilson RW & Floyd MM, 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. *Intern J System and Evol Microbiol,* 54:1653-1667.

Schulze-Röbbecke R, Weber A & Fischeder R, 1991- Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples. *J Microbiol Methods,* 14 : 177-183.

Selvakumar N, Vanajakumar, Gopi PG, Venkataramu KV, Dallas M, Paramasivan CN & Prabhakar R, 1995- Isolation of tubercle bacilli from sputum samples of patients in the field studies by the Cetylpyridinium Chloride-Sodium Chloride and Sodium Hydroxide methods. *Indian J Med Res,* 102: 149-51.

Selvakumar N, Gomathi Sekar M, Kumar V, Vijaya Bhaskar Rao D, Rahman F & Narayanan PR, 2006 - Sensitivity of Ziehl-Neelsen method for centrifuged deposit smears of

sputum samples transported in cetyl-pyridinium chloride. *Indian J Medical Res,* 124 : 439-442.

Serra C, Loi G, Saddi B, Pautasso M & Manzin A, 2007- Unusual clinical presentation of *Mycobacterium fortuitum* infection in an immunocompetent woman. *J Clin Microbiol,* 45 : 1663-1665.

Shehan JM & Sarma DP, 2008- *Mycobacterium mucogenicum*: report of a skin infection associated with etanercept. *Dermatol Online J,* 14 : 5.

Schiavone S & Coquery M, 2011- Guide d'échantillonnage et de pré-traitement des sédiments en milieu continental pour les analyses physico-chimiques de la DCE. *Cemagref,* p24

Shinnick TM & Good RC, 1994 - Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis,* 13 : 884 - 901.

Sighomnou D, Mahieux A, Chevalier P, 1983- Mesures de débit pour l'aménagement rizicole de la plaine de la Loka à Sakassou (Cote d'Ivoire), Office de la recherche scientifique et technique Outre-mer, Centre d'Adiopodoumé, 21 p.

SkermanVBD, McGowan V & Sneath PHA, 1989- Approved lists of bacterial names. A. edition Eds. Washington (DC), in *Am Society of Microbiol Press*.

SkermanVBD, McGowan V & Sneath PHA, 1980- Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol,* 30: 225-420.

Smithwick RW, Stratigos CB & David HL, 1975- Use of Cetylpyridinium Chloride and Sodium Chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol,* 1 : 411-3.

Smole SC, McAleese F, Ngampasutadol J, Von Reyn CF & Arbeit RD, 2002 - Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by Restriction and Sequence Analysis of *hsp*65. *J Clin Microbiol,* 40 : 3374- 3380.

Sniezek PJ , Graham BS, Busch HB, Lederman ER, Lim ML & Poggemyer K, 2003- Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. *Archives of Dermatol Research,* 139 : 629-634.

Soldati G, Lu ZH, Vaughan L, Polkinghorne A, Zimmermann DR & Huder JB, 2004 - Detection of *Mycobacteria* and *Chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: A retrospective study. *Veterinary Path,* 41 : 388-397.

Somoskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, Jonas V, Stasik D & Parsons LM, 2000- False-positive results for *Mycobacterium celatum* with the AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* complex assay. *J Clin Microbiol,* 38 : 2743-2745.

Spangenberg T & Kishi Y, 2010- Highly sensitive, operationally simple, cost/time effective detection of the mycolactones from the human pathogen Mycobacterium ulcerans. *Chem Commun (Camb),* 46: 1410-1412.

Soudani A, Hadjfredj S, Zribi M, Masmoudi A, Messaoud T & Tiouri H, 2007- Characterization of Tunisian *Mycobacterium tuberculosis* rifampin-resistant clinical isolates. *J Clin Microbiol,* 45 : 3095-3097.

Stahl DA & Urbance JW, 1990- The Division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol,* 172 : 116-124.

Stadthagen-Gomez G, Helguera-Repetto AC, Cerna-Cortes JF, Goldstein RA, Cox RA & Gonzalez-y-Merchand JA, 2008 - The organization of two rRNA (*rrn*) operons ofthe slow-growing pathogen *Mycobacterium celatum* provides key insights into mycobacterial evolution. *FEMS Microbiol Letters,* 280 : 102-112.

Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, Davis JR, Hooper NM & Baker JF, 1991 - Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *J Clin Microbiol,* 29 : 154-157.

Steed KA & Falkinham JO, 2006 - Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *App Environ Microbiol,* 72 : 4007-4011.

Steinert M, Birkness KA, White EH, Fields B & Quinn F, 1998 - *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *App Env Microbiol,* 64 : 2256-2261.

Stinear TP, Ross B, Davis J, Marino L, Robins-Browne R, Oppedinaso F, Sievers A & Johnson PD, 1999- Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. *J Clin Microbiol,* 37: 1018-1023.

Stinear T, Davies JK, Jenkin GA, Hayman JA, Oppedisano F & Johnson PD, 2000- Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol,* 66: 3206-3216.

Stinear TP, Mve-Obiang A, Small PL, Frigui W, Pryor MJ, 2004- Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 101: 1345-1349.

Stinear TP, Hong H, Frigui W, Pryor MJ, Brosch R, Garnier T, Leadlay PF & Cole ST, 2005a- Common evolutionary origin for the unstable virulence plasmid pMUM found in geographically diverse strains of *Mycobacterium ulcerans*. *J Bacteriol,* 187: 1668-1676.

Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, Garnier T, Meurice G, Simon D, Bouchier C, Laurence M, Tichit M, Porter JL, Ryan J, Johnson PDR, Davies JK, Jenkin GA, Small PLC, Jones LM, Tekaia F, Laval F, Daffé M, Parkhill J, Cole ST, 2007- Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Gen Res,* 17: 192-200.

Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK & Johnson PDR, 2010 - Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gen Res,* 18 : 729-741.

Stragier P, Ablordey A, Meyers WM & Portaels F, 2005 -Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Bacterio,* 187:1639-1647.

Stragier P, Ablordey A, Bayonne LM, Lugor YL, Sindani IS, Suykerbuyk P, Wabinga H, Meyers WM & Portaels F, 2006- Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* isolates from Africa. *Emerg Infect Dis,* 12:844-847.

Stragier P, Ablordey A, Durnez L, Portaels F, 2007- VNTR analysis differentiates *Mycobacterium ulcerans* and IS*2404* positive mycobacteria. *Syst Appl Microbiol*; 30: 525-530.

Sung N & Collins MT, 2003 -Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *App Environ Microbiol,* 69: 6833-6840.

Sutherland TD, Horne I, Harcourt RL, Russel RJ & Oakeshott JG, 2002 - Isolation and characterization of *Mycobacterium* strain that metabolizes the insecticide endosulfan. *J App Microbiol,* 93 : 380-389.

Swanson DS, Kapur V, Stockbauer K, Pan X, Frothingham R & Musser JM, 1997 - Subspecific differentiation of *Mycobacterium avium* complex strains by automated sequencing of a region of the gene (*hsp*65) encoding a 65-Kilodalton Heat Shock Protein. *Intern J System Bacteriol,* 47 : 414-419.

Tacquet A & Tison F, 1961 - Nouvelle technique d'isolement des Mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium. *Anles Institut Pasteur,* 100: 676- 680.

Tacquet A & Tison F, 1966 - L'utilisation des détergents pour l'isolement des Mycobactéries. *Bul Intern Union Against Tuberculosis,* 38 : 59-67.

Takade A, Umeda A, Matsuoka M, Yoshida SI, Nakamura M & Amako K, 2003- Comparative studies of the cell structures of Mycobacterium leprae and M. tuberculosis using the electron microscopy freeze-substitution technique. *Microbiol Immunol,* 47 : 265-270.

Takeya K, Nakayama Y & Nakayama H, 1967- Relationship between *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium runyonii*. *Am Rev Respir Dis,* 96**:** 532-5.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC & Bodmer T, 1993- Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol,* 31**:** 175-8.

Telenti A 1998- More on 'What's in a name …' - pragmatism in mycobacterial taxonomy. *Int J Tuberc Lung* Dis, 2: 182-183.

Timpe A & Runyon EH, 1954 - The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease ; a preliminary report. *J labo clin med,* 44 : 202-209.

Thibert L & S Lapierre, 1993 - Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol,* 31: 1759-1763.

Thorel MF & Boisvert H, 1976 - Action de l'acide sulfurique à 4 p. cent sur les diverses espèces de Mycobactéries. *Annales Biol Clinique,* 34 : 431-435.

Thorel MF, 1989 - Relationship between *Mycobacterium avium, M. paratuberculosis* and mycobacteria associated with Crohn's disease. *Annals Rech Vétérinaires,* 20: 417-429.

Thorel MF, Krichevsky M & Lévy-Frébault VV, 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. *Intern J Syst Bacteriol,* 40 : 254-260.

Thomson R, Carter R, Gilpin C, Coulter C & Hargreaves M, 2008 -Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *App Environ Microbiol,* 74: 3094-3098.

Thomson R, 2010- Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *EID,* 16:1576-1582.

Thornton CG, Maclellan KM, Brink TL & Passen S, 1998- In vitro comparison of NALCNaOH, tween 80, and C18 carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol,* 36 : 3558-3566.

Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E, Suutari M, Paulin L & Rudbäck E, 2001 - Characterization of *Mycobacterium bohemicum* isolated from human, veterinary, and environmental sources. *J Clinic Microbiol,* 39 : 207-211.

Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E, Tortoli E, Suutari M, Seppänen J, 2002- *Mycobacterium palustre* sp. nov., a potentially pathogenic, slowly growing *Mycobacterium* isolated from clinical and veterinary specimens and from Finnish stream waters. *Intern J Syst Evol Microbiol,* 52 : 1519-1525.

Torrado E, Fraga AG, Castro AG, Stragier P, Meyers WM, Portaels F, Silva MT & Pedrosa J, 2007-. Evidence for an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun,* 75: 977-987.

Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, Cichero P, Farina C, Mucignat G, Scarparo C, Bartolini L, Valentini R, Nista D, Gesu G, Tosi CP, Crovatto M & Brusarosco G, 2001- Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 39:1079-1084.

Tortoli E, Mariottini A & Mazzarelli G, 2003- Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol,* 41 : 4418- 4420.

Tortoli E, Rindi L, Garcia M J, Chiaradonna P, Dei R & Garzelli C, 2004- Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera sp.* nov. *Intern J System Evol Microbiol,* 54 : 1277-1285.

Tortoli E, 2006- The new mycobacteria: an update. *FEMS Immun Med Microbiol,* 48: 159-178.

Torvinen E, Lehtola MJ, Martikainen PJ & Miettinen IT, 2007 - Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected bywater flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. *App Env Microbiol,* 73 : 6201-6207.

Trevisan V, 1889b - I generi e la specie dell batteriaceee. *Zanaboni e Gabuzzi Milano* 1: 14.

Trujillo M, Velazquez E, Kroppenstedt RM, Schumann P, Rivas R & Mateos PF, 2004- *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. *Intern J System Evol Microbiol,* 54 : 1459-1463.

Tsintzou A, Vantarakis A, Pagonopoulou O, Athanassiadou A & Papapetropoulou M, 2000 -Environmental mycobacteria in drinking water before and after replacement of the water distribution network. *Water Air Soil Pol,* 120 : 273-282.

Tsukamura M, Toyama H & Mizuno S, 1965- *Mycobacterium parafortuitum*, a new species. *Med Biol,* 70 : 232-235.

Tsukamura M, Mizuno S & Toyama H, 1983a- *Mycobacterium pulveris* sp. nov., a Nonphotochromogenic *Mycobacterium* with an Intermediate Growth Rate. *Int J Syst Bacteriol,* 33 : 811-815.

Tsukamura M, Van der Meulen HJ & WOK Grabow, 1983c- Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum sp.* nov. and *Mycobacterium diernhoferi sp.* nov. *Intern J Syst Bacteriol,* 33 : 460- 449.

Tsukamura M, 1984- Identification of mycobacteria. *Mycobacteriosis res lab*, National Chubu Hospital, Japan.

Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, Arakawa H & Kuze A, 1988- Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. *Am Rev Respir Dis*, 137: 1280-1284.

Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J & Kabani A, 2001 - Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: Identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol*, 40 : 3637-3648.

Turenne C, Chedore C, Wolfe J, Jamieson F, Broukhanski G & K, May 2002 - *Mycobacterium lacus* sp. nov., a novel slowly growing, non-chromogenic clinical isolate. *Intern J Syst Evol Microbiol*, 52: 2135-2140.

Turenne CY, Thibert L, Williams K, Burdz TV, Cook VJ & Wolfe JN, 2004b - *Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobepositive for *Mycobacterium avium* complex. *Intern J Syst Evol Microbiol*, 54 : 659-667.

Turenne CY, Semret M, Cousins DV, Collins DM & Behr MA, 2006 - Sequencing of *hsp*65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol*, 44 : 433-440.

Ucko M & Colorni A, 2005 - *Mycobacterium marinum* infections in fish and humans in Israel. *J Clin Microbiol*, 43 : 892-895.

Ulysse Ateba Ngoa, Gregoire K Adzoda, Bayonne Manou Louis, Ayola Akim Adegnika & Bertrand Lell, 2012- Buruli Ulcer in Gabon, 2001–2010. *Emerg Infect Dis* Vol. 18, No. 7

Uyttebroek M, Breugelmans P, Janssen M, Wattiau P, Joffe B & Karlson U, 2006 - *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. *Environ Microbiol*, 8 : 836- 847.

Uyttebroek M, Spoden A, Ortega-Calvo JJ, Wouters K, Wattiau P & Bastiaens L, 2007a-Differential responses of *Eubacterial*, *Mycobacterium*, and *Sphingomonas* communities in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. *J Environ Qual*, 36 : 1403-1411.

Uyttebroek M, Vermeir S, Wattiau P, Ryngaert A & Springael D, 2007b - Characterization of cultures enriched from acidic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH. *A Environ Microbiol*, 73 : 3159-3164.

Van der Geize R, Yam K, Heuser T, Wilbrink MH, Hara H & Anderton MC, 2007 - A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into

Mycobacterium tuberculosis survival in macrophages. *Proceedings of the National Ac Sc U S A*, 104 : 1947-1952.

Van der Sar AM, Abdallah AM, Sparrius M, Reinders E, Vandenbroucke-Grauls CM & Bitter W, 2004 - *Mycobacterium marinum* strains can be divided into two distinct types based on genetic diversity and virulence. *Infct Immun*, 72 : 6306-6312.

Van Ingen J, Boeree MJ & Dekhuijzen PN, 2008- Clinical relevance of *M. simiae* in pulmonary samples *Eur Respir J* , 31 : 106-109

Van Ingen J, Boeree MJ, Kösters K, Wieland A, Tortoli E & Dekhuijzen PNR, 2009c - Proposal to elevate Mycobacterium avium complexITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris sp*. nov. *Intern J System Evol Microbiol*, 59 : 2277-2282.

Van Klingeren B & Pullen W, 1987- Comparative testing of disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium terrae* in a quantitative suspension test. *J Hosp Infect*; 10 : 292-8.

Vantarakis A, Tsintzou A, Diamandopoulos A & Papapetropoulou M, 1998- Nontuberculosis mycobacteria in hospital water supplies. *Water Air Soil Pol*, 104 : 331-337.

Veyrier F, Pletzer D, Turenne C & Behr MA, 2009 - Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evol Biology*, 196 : 1-14.

Villanueva A, Calderon RV, Vargas BA, Ruiz F, Aguero S, ZhangY, Brown BA & Wallace RJJr, 1997- Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 24 **,** 1147-53.

Vugia DJ, Jang Y, Zizek C, Ely J, Winthrop KL & Desmond E, 2005- Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California. *Emerg Infect Dis*, 11: 616-618.

Wallace RJJr, Brown BA & Griffith DE, 1998- Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol*, 52: 453-490.

Wayne LG, Doubek JR & Russel , 1964- Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate. *Am Rev Respir Dis*, 90: 588- 597.

Wayne LG, 1966- Classification and identification of mycobacteria. III. Species within Group III. *Am Rev Respir Dis*, 93 : 919-928.

Wayne LG, Good RC, Tsang A, Butler R, Dawson D & Groothuis D, 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. *Intern J Syst Bacteriol,* 43 : 482-489.

Wang SX, SNG LH, Leong NH & Tan BH, 2004- Direct identification of *Mycobacterium ulcerans* in skin lesions of immunocompromised patients by PCR restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol,* 42 :3336-3338.

Wansbrough-Jones M & Phillips R, 2006- Buruli ulcer: emerging from obscurity. *L* 367: 1849-1858.

Wayne LG, 1982 - Microbiology of tubercle bacilli. *Amer Rev Resp Dis,* 125: 31-410.

William DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PRJ & Gillis TP, 1998- Contribution of rpoB Mutations to Development of Rifamycin Cross- Resistance in *M. Tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chem*, 7: p 1853-1857.

Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, Beachboard DC & Kimbirauskas RK 2008- Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli Ulcer Endemic and Non-Endemic Aquatic Sites in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis,* 2 : 205.

Williamson HR, Benbow ME, Campbell LP, Johnson CR & Sopoh G 2012- Detection of *Mycobacterium ulcerans* in the Environment Predicts, Prevalence of Buruli Ulcer in Benin. *PLoS Negl Trop Dis,* 6 : 1506

Wilton S & Cousins D, 1992- Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl,* 1 :269-273.

Winthrop KL, Abrams M, Yakrus MA , Schwartz I, Ely J & Gillies D, 2002 - An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. *New England J Medicine,* 346 : 1366-1371.

White DC, Lytle CA, Gan YDM, Piceno YM, Wimpee MH & Peacock AD, 2002 - Flash detection/identification of pathogens, bacterial spores and bioterrorism agent biomarkers from clinical and environmental matrices. *J Microbiol Methods,* 42 : 139-147.

Whittier S, Hopfer RL, Knowles MR & Gilligan PH, 1993- Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol,* 31: 861-864.

Whittington RJ, Marsh I, McAllister S, Turner MJ, Marshall DJ & Fraser CA, 1999- Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol,* 37 : 1077-1083.

Whittington RJ, Marshall J, Nicholls PJ, Marsh LB & Reddacliff LA, 2004 - Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *App Env Microbiol,* 70: 2989-3004.

Witte CL, Hungerford LL, Papendick R, Stalis IH & Rideout BA, 2008 - Investigation of characteristics and factors associated with avian mycobacteriosis in zoo birds. *J Vet Diagnostic Investigation,* 20 : 186- 196.

Wolinsky E, 1979 - Nontuberculous mycobacteria and associ-ated diseases. *Am Rev Respir Dis,* 119: 107-159.

Woods GL & Walker DH, 1996 - Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clin Microbiol Rev,* 9 : 382-404.

Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA, Gonzalez PC, Reingold AL & Horsburgh CR, 1993 - Comparison of four decontamination methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from stools. *J Clin Microbiol,* 31: 302-306.

Yip MJ, Porter JL, Fyfe-Janet AM, Lavender CJ, Portaels F, Rhodes M, Kator H, Colorni A, Jenkin GA & Stinear T, 2007- Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone-producing mycobacteria from a common *Mycobacterium marinum* progenitor. *J Bacteriol,* 189: 2021-2029.

Yates MD, Pozniack A & Uttley AHC 1997- Isolation of environmental mycobacteria from clinical specimen in South-East England: 1973–1993 *Int J Tuberc Lung Dis,* 1 : 75-80

Yoder S, Argueta C, Holtzman A, Aronson T, Berlin OGW & Tomasek P 1999- PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *A Environ Microbiol,* 65 : 2650-2653.

Zakham F, Belayachi L, Ussery D, Akrim M, Benjouad A, El Aouad R & Ennaji MM, 2011-Mycobacterial species as case-study of comparative genome analysis. *Cell Mol Biol,* 57 : 1462-1469.

Ziza JM & Desplaces N 2006 - Infections ostéoarticulaires à Mycobactéries atypiques. *Rev rhum,* 73 : 394-400.

Zolg JW & Philippi-Schulz S, 1994 - The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J Clin Microbiol,* 32: 2801- 2812.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation du milieu de Löwenstein modifié par Jensen (1932)

1er jour

Préparation du milieu de base :

- Utiliser un agitateur magnétique chauffant et un barreau aimanté.
- Dans un ballon contenant 600 ml d'eau distillée et 12 ml de glycérol, transférer 37,2 g de poudre Löwenstein-Jensen.
- Agiter constamment en chauffant et laissez bouillir pendant 1 minute jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène et translucide.
- Stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C.

Conserver cette préparation dans une étuve à 52°C jusqu'au lendemain.

2ème jour

Stérilement, préparer un litre d'oeufs frais sans antibiotique :

- Brosser délicatement environ 25 oeufs puis les faire tremper dans une solution de soude à 5% pendant 30 minutes.
- Rincer les oeufs à l'eau courante.
- Mettre à tremper les 25 oeufs pendant 10 minutes dans de l'eau additionnée d'un volume égal d'alcool dénaturé (1 litre d'eau + 1 litre d'alcool dénaturé).
- Egoutter puis essuyer chaque oeuf avec une compresse stérile.
- Passer les oeufs rapidement à la flamme avant de les casser l'un après l'autre dans un bécher stérile.
- Tout oeuf d'aspect douteux sera éliminé (changer de bécher stérile).
- Avant de casser l'oeuf suivant, verser le contenu du bécher dans une éprouvette stérile et jaugée à 1 litre.
- Transférer le litre d'oeufs dans un mixeur ou dans un ballon contenant des billes de verre stériles : bien mélanger et filtrer sur une gaze stérile.
- Aseptiquement; verser les oeufs dans le récipient contenant le milieu de base préparé le 1er jour et conservé à 52°C. Mélanger (utiliser un agitateur magnétique chauffant ou une baguette de verre). Laissé le mélange reposer pendant 1 heure à 52°C.

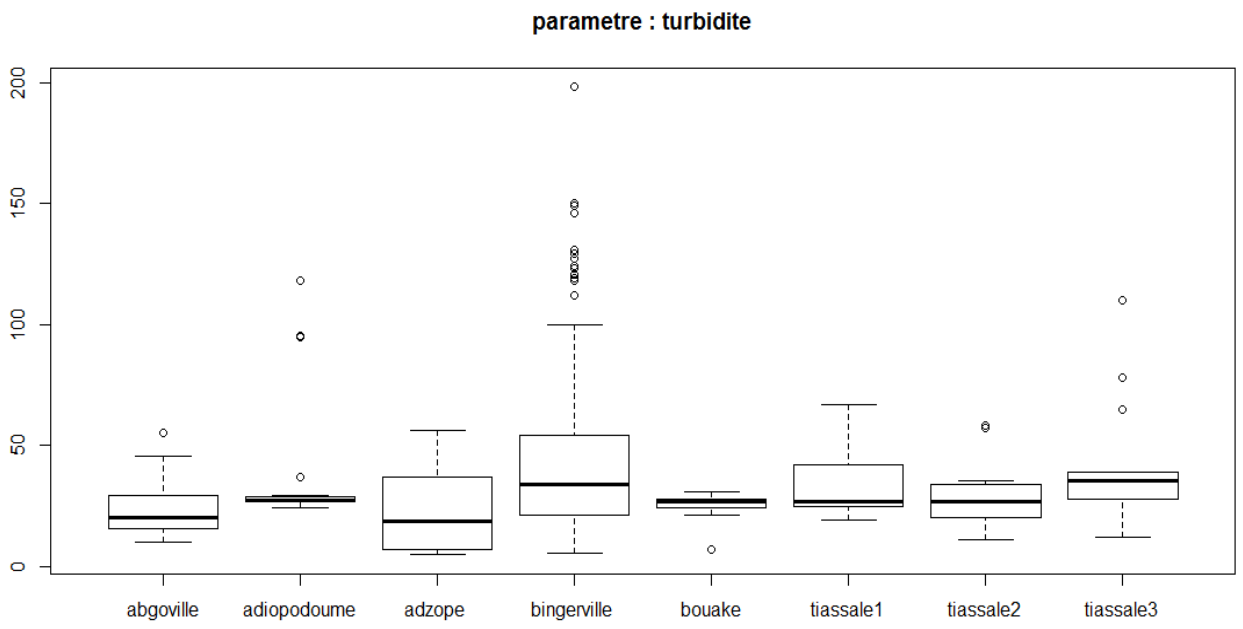
Distribution et coagulation :

- Pour modèle du volume à distribuer lors du remplissage des tubes, préparer un tube témoin à vis de 16 x 160, contenant 6 ml de milieu (même volume que le tube témoin).
- Travailler aseptiquement en flambant le haut du tube avant et après ouverture. Reboucher les tubes.
- Coaguler pendant 40 minutes en position inclinée à 85°C dans un autoclave ou dans des appareils préalablement chauffés (coagulateur à trou, étuve).
- De coloration jaune clair à la sortie du coagulateur, les tubes verdiront légèrement par la suite.
- Dévisser légèrement tous les tubes. Les conserver pendant 2 jours à température ambiante et à l'obscurité pour permettre une évaporation de l'eau de condensation.
- Revisser puis distinguer chaque lot de fabrication avec une étiquette de couleur par exemple.
- Conserver les tubes à 4°C en position inclinée.

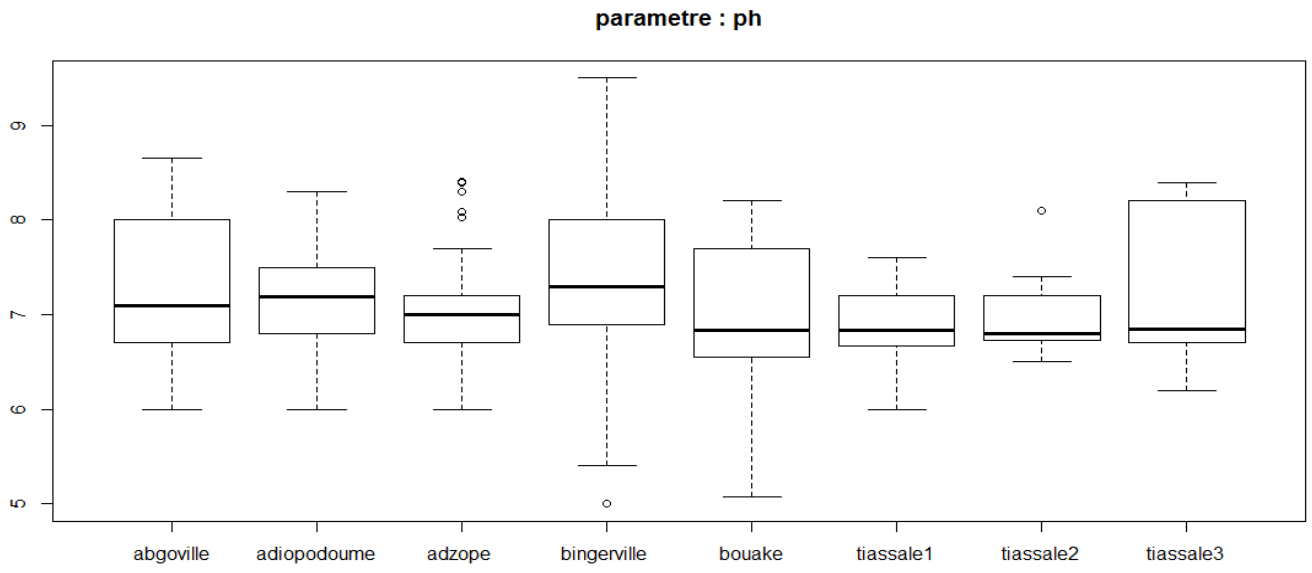
Annexe 2 : Caractères d'identification des Mycobactéries du groupe IV (Croissance en moins de 8 jours)

Mycobacterium	*fortuitum*	*peregrinum*	*abscessus*	*chelonae*	*mucogenicum*	*immunogenum*	*senegalense*	*vaccae*	*smegmatis*	*phlei*
Pigmentation	**Achro [a]**	**Achro**	**Achro**	**Achro**	**Achro**	**Achro**	**Achro**	**Photo [c]**	**Achro/ Scoto [d]**	**Scoto**
Croissance à 37°C	+	+	+/- [e]	+/- [e]	+	+/- [e]	+	+	+	+
42°C	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
52°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrate réductase	+	+	-	-	+/- [e]	-	+	+	+	+
Arylsulfatase à 3 jours	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Croissance sur gélose Mac Conkey	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Croissance en présence de 5% NaCl	+	+	+	-	-	-	+	+/- [e]	+	+
CFA [f]	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Utilisation du lévulose	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Utilisation du mannitol	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Utilisation de l'inositol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Croissance sur citrate de sodium	-	-	-	+	+/- [e]	-	+	+	+	+

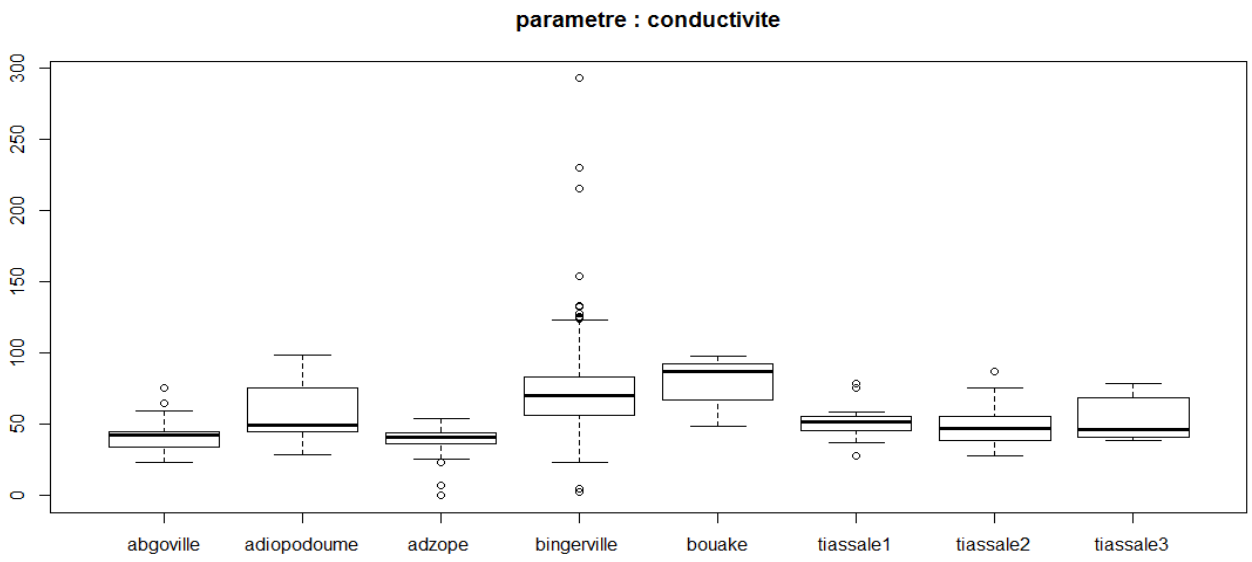
a / Achro : achromogène. Non pigmenté ; b Scoto : scotochromogène ; c Photo : photochromogène ; d *M. smegmatis* : en vieillissant, les colonies se pigmentent (scotochromogène) ; e +/- : variable ; f CFA : Citrate de Fer Ammoniacal (brunissement des colonies).



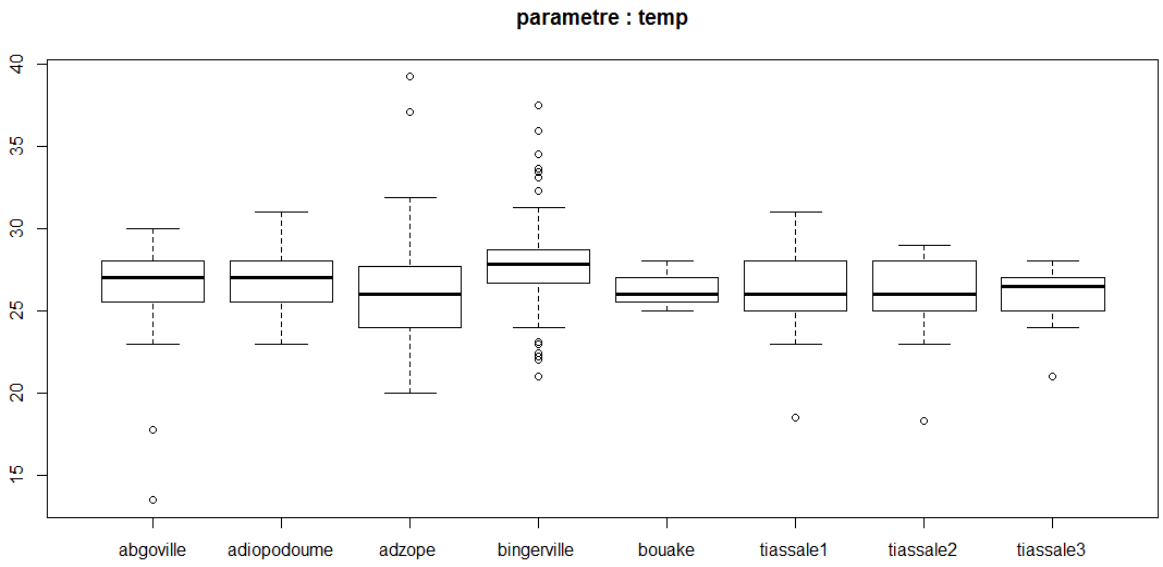
DISTRIBUTION SPATIALE DE LA TURBIDITE



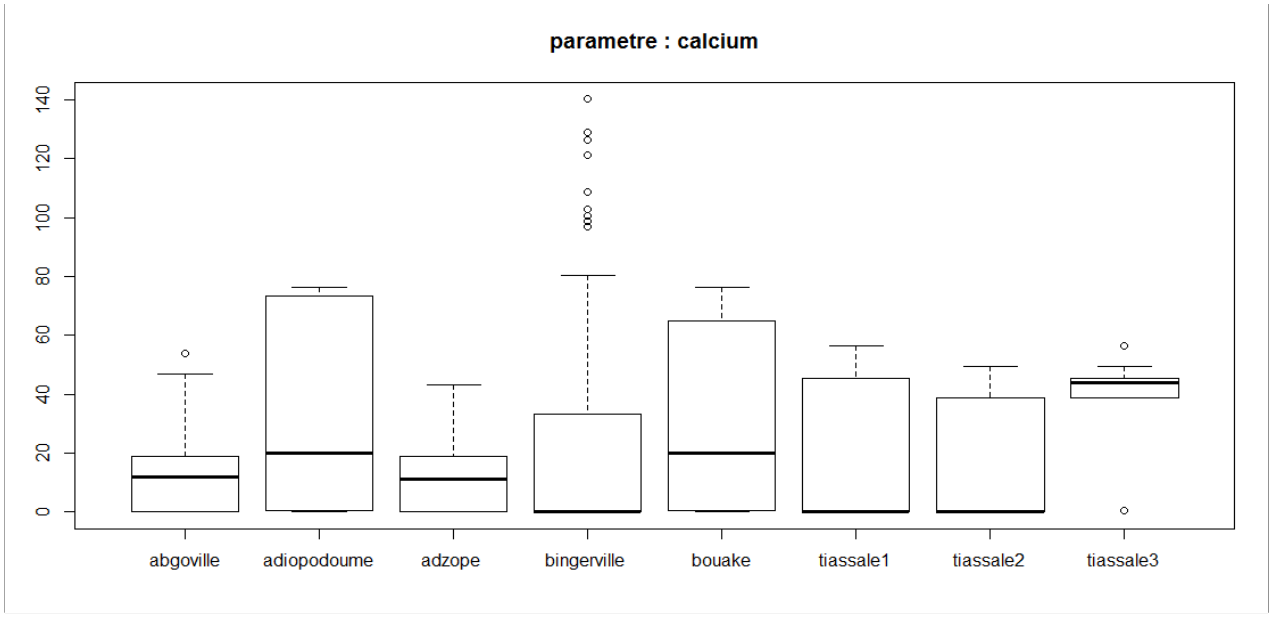
DISTRIBUTION SPATIALE DU pH



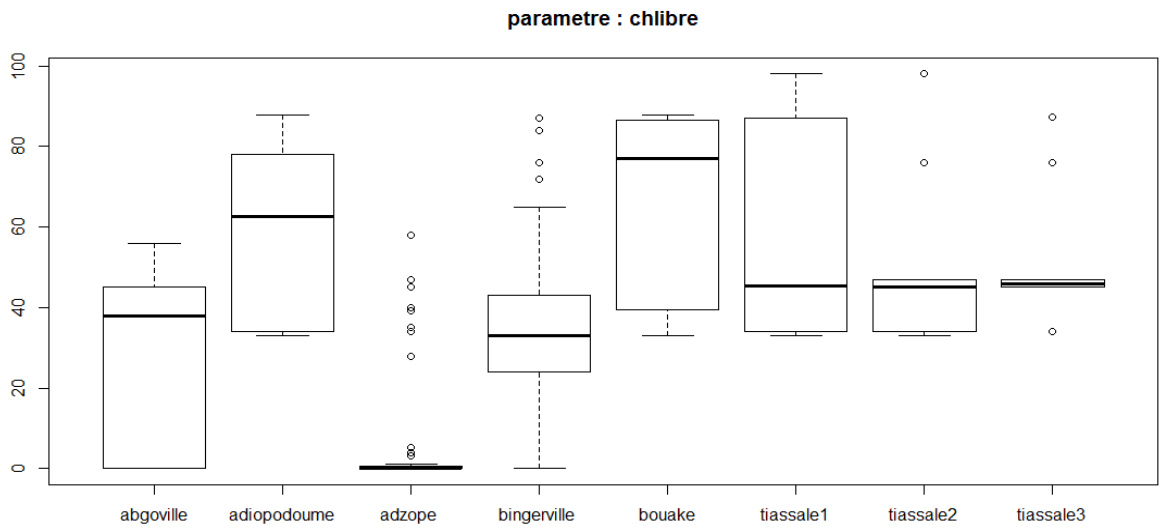
DISTRIBUTION SPATIALE DE LA CONDUCTIVITE



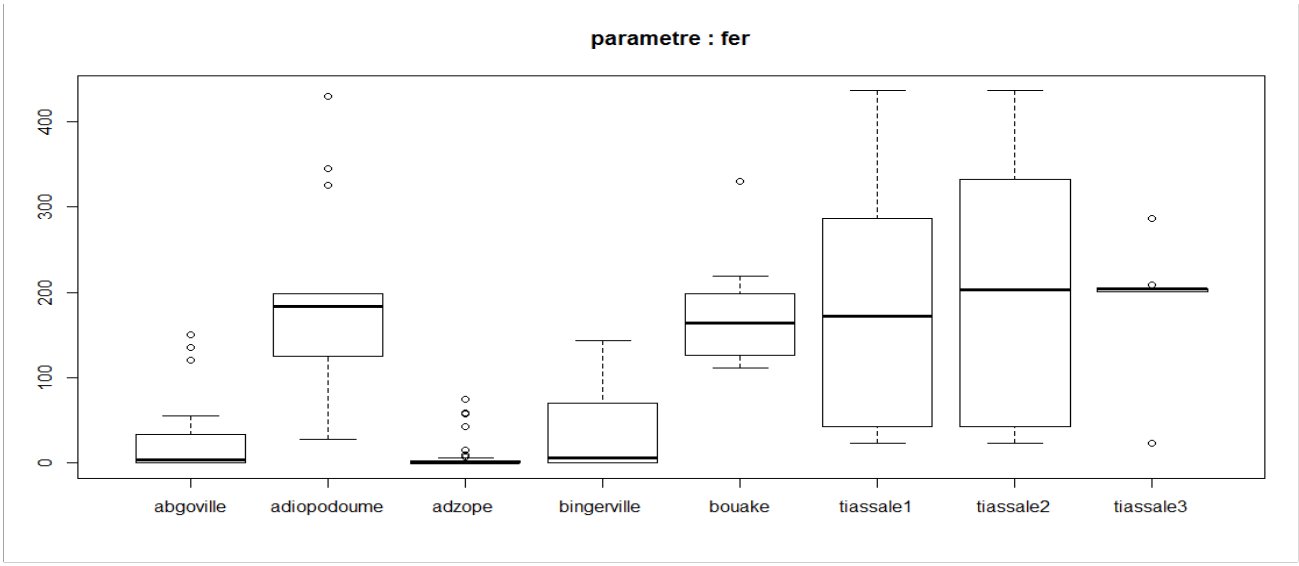
DISTRIBUTION SPATIALE DE LA TEMPERATURE



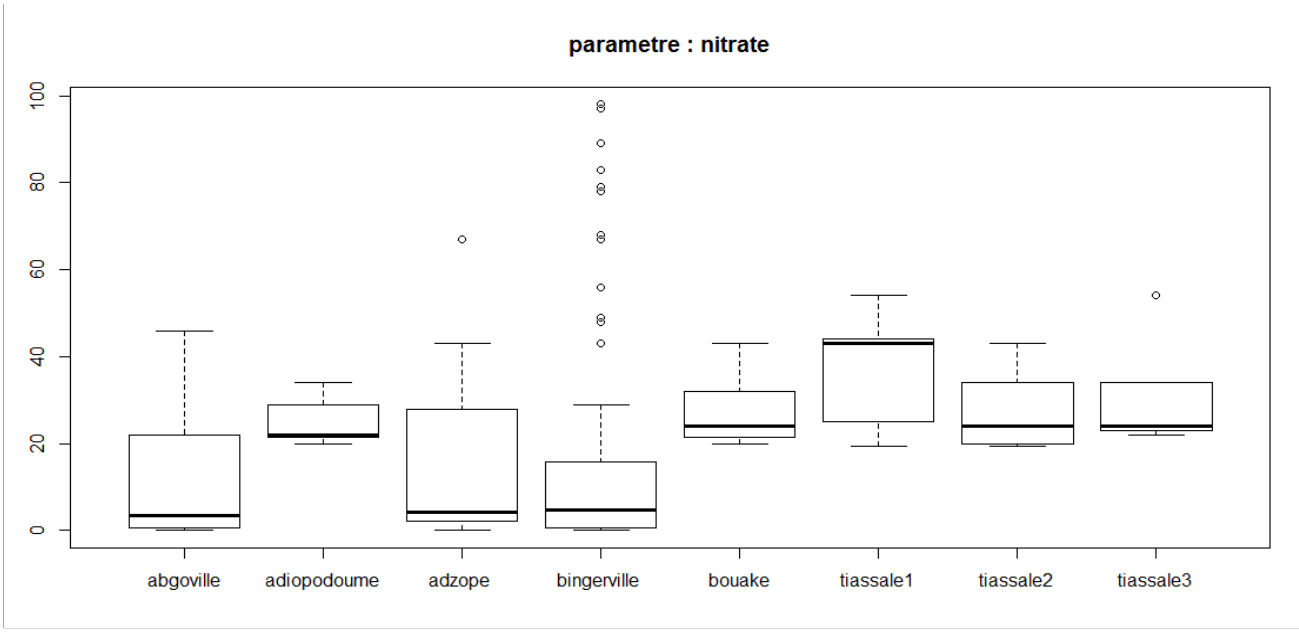
DISTRIBUTION SPATIALE DU CALCIUM



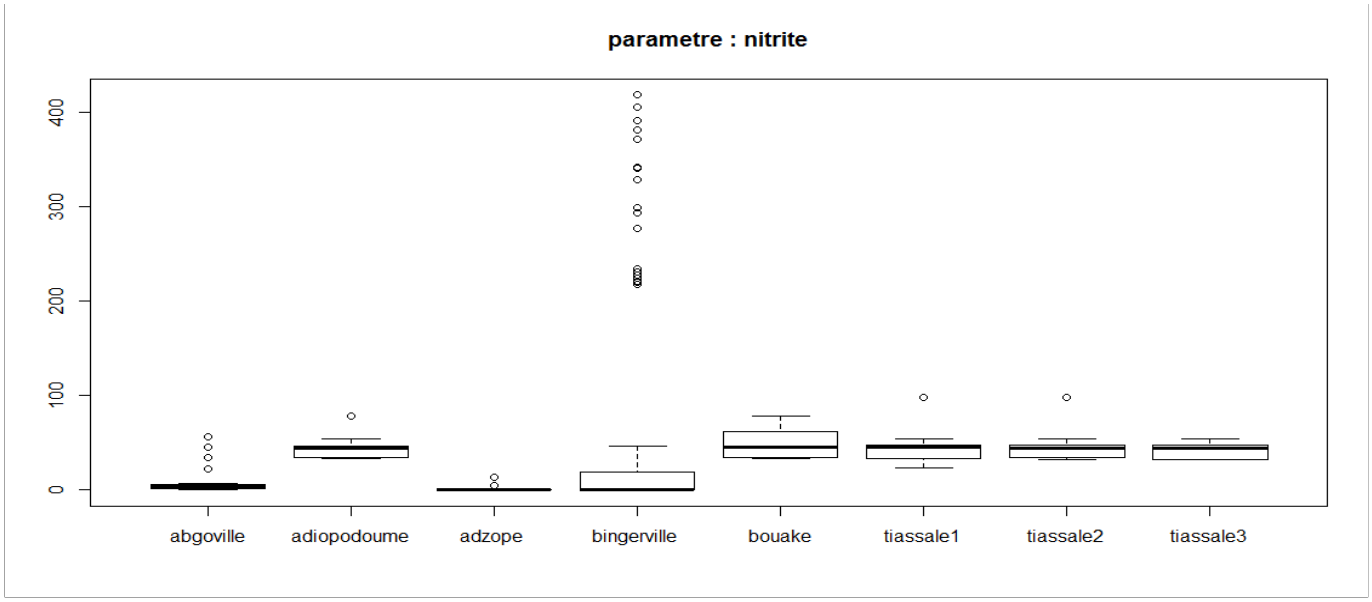
DISTRIBUTION SPATIALE DU CHLORE LIBRE



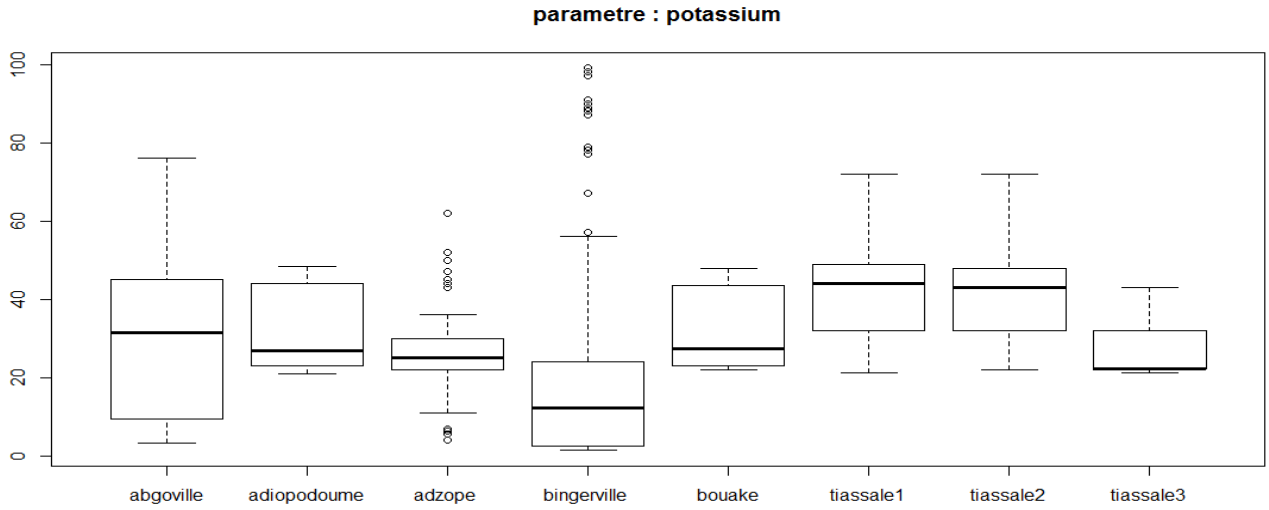
DISTRIBUTION SPATIALE DU FER



DISTRIBUTION SPATIALE DU NITRATE

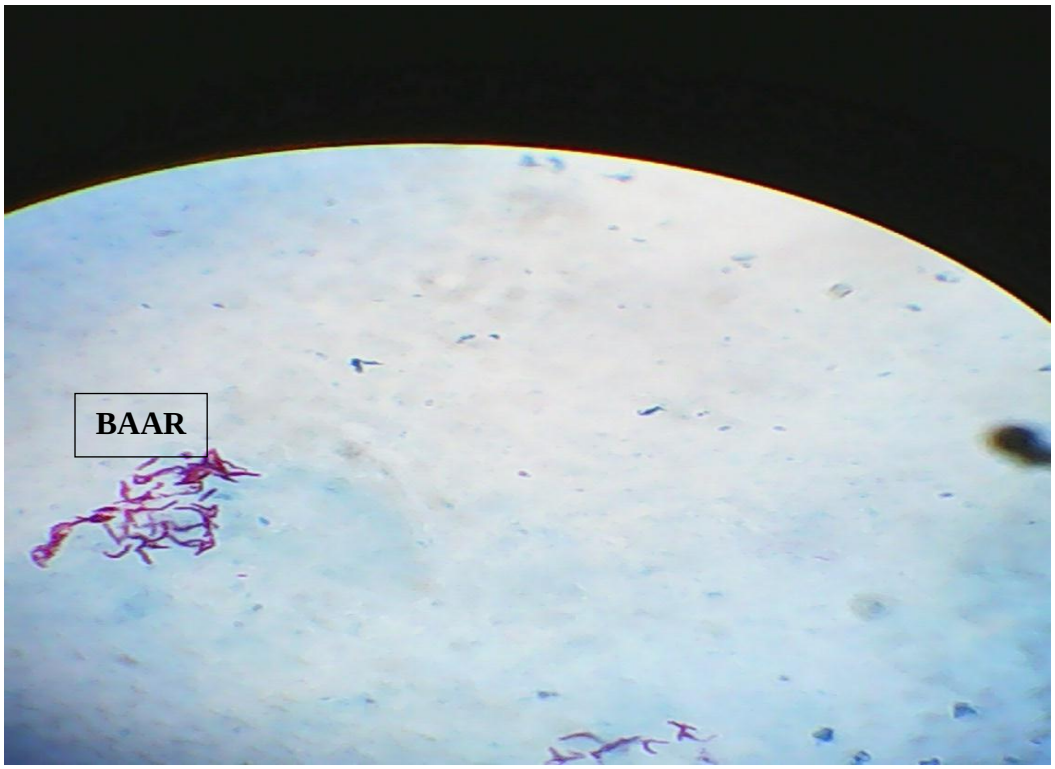


DISTRIBUTION SPATIALE DU NITRITE



DISTRIBUTION SPATIALE DU POTASSIUM

Exple de site : Marre de SOKROGBO (site 1 et 2), Photo : IPCI.



PRESENCE DE Bacilles Acido-Alcoolo Resistants (BAAR) AU MICROSCOPE, *Photo: IPCI*

Donnees GPS des différents points de prelevement

Site	Point de prélèvement	Longitude	Latitude
Adzope	Adzopé1	06°06'39.9"	003°51'32.9"
Adzope	Adzopé2	06°06'39.6"	003°51'33.0"
Adzope	Adzopé3	06°06'49.7"	003°51'37.0"
Adzope	Adzopé3	06°06'49.7"	003°51'37.0"
Agboville	Abgoville	05°56'22.1"	004°12'55.8"
Agboville	Abgoville	05°56'22.1"	004°12'55.8"
Bingerville	Aguien1	05°24.183’	003°50.913’
Bingerville	Aguien2	05°24.064’	003°50.408’
Bingerville	Aguien 3	05°23.209’	003°50.486’
Bingerville	Aguien 4	05°25.659’	003°54.231’
Bingerville	Aguien 5	05°26.173’	003°55.246’
Bingerville	Aguien 6	05°24.909’	003°53.741’
Bingerville	Aguien7	05°24.173’	003°51.233’
Bingerville	Aguien8	05°25.207’	003°53.732’
Bingerville	Aguien 9	05°25.362’	003°53.746’
Bingerville	Aguien 10	05°25.655’	003°53.603’
Bingerville	Aguien 11	05°23.209’	003°50.486’
Adiopodoume	Adiopodoume 1	05°20.349’	004°07.442’
Adiopodoume	Adiopodoume 2	05°20.342’	004°07.453’
Tiassale	Bodo	05°54.909’	004°40.950’
Tiassale	Sokrogbo1	06°02.750’	004°58.099’
Tiassale	Sokrogbo2	06°02.516’	004°58.158’

Etang de Bodo, Tiassalé, ***Photo : Vakou s***

PUBLICATIONS

academicJournals

Vol. 10(40), pp. 1703-1710, 28 October, 2016
DOI: 10.5897/AJMR2016.8267
Article Number: 88E7DB861336
ISSN 1996-0808
Copyright © 2016
Author(s) retain the copyright of this article
http://www.academicjournals.org/AJMR

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Microbiological and molecular characterization of environmental mycobacterium strains isolated from the Buruli ulcer endemic and non-endemic zones in Côte d'Ivoire

Sabine N. Vakou[1,2]*, Julien Coulibaly-Kalpy[1,2], Solange E. Kakou-Ngazoa[1], N`guetta Aka[1], N`golo D. Coulibaly[1], Mireille Dosso[1] and Allico J. Djaman[1,2]

[1]Pasteur Institute of Ivory Coast, 01 BP 490 Abidjan, Côte d'Ivoire.
[2]University of Felix Houphouët Boigny, Ivory Coast, Côte d'Ivoire

Received 12 August 2016, Accepted 27 September, 2016

***Mycobacterium ulcerans (MU)*, the causative agent of Buruli ulcer (BU), skin disease, is considered to be an environmental pathogen. The pathogenic virulence of *MU* is being linked to the expression of toxin called Mycolactone. Genetic analyses have shown the high diversity with variable number tandem repeats (VNTR) and mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) in *M. ulcerans* and in mycolactone producing Mycobacteria (MPMs). The purpose of this study is the molecular characterization of potentially pathogenic environmental mycobacteria strain, apart from the *M. ulcerans,* from aquatic environments in Côte d'Ivoire. A total of 473 samples were collected comprising of 251 water and 222 sediment based on sampling sites. The sediments were the most contaminated by mycobacteria with 60% as against 43.3% in water samples from the hyper endemic areas. In hypo-endemic areas, water was the most contaminated with 53.57% against 43.24% in sediment. Microscopy by Ziehl-Neelsen-staining, and PCR diagnostics using IS2404 and KR were performed on strains. 20% fast growing isolated mycobacteria species including *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium peregrinum* and *Mycobacterium* sp. was found carrying the IS2404 gene previously found in *M. ulcerans.* 9.23% of strains carry the ketoreductase (KR) genes, one of the synthesis of mycolactone enzymes. In terms of genetic analysis using the MIRU/VNTR, the MIRU 1 was the most amplified sequence, and LOCUS 6 less amplified; no known profile have been identified in this study. This study is the first step taken in order to understand different skin infections encountered in Côte d'Ivoire.**

Key words: Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeats (MIRU-VNTR; ketoreductase, LOCUS 6, IS2404, *Mycobacteria*, Buruli ulcer.

INTRODUCTION

Mycobacteria are germs that cause lung infections, skin or lymph (Griffith et al., 2007). They are found in the environment like in the soil, water, aerosols, plants, aquatic animals (Winthrop et al., 2002; Sniezek et al.,

*Corresponding author. E-mail: vsalger@yahoo.fr. Tel: +22508837644.

Author(s) agree that this article remains permanently open access under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 International License

2003; Marsollier et al., 2002, 2004). This Acid-Alcohol Bacillus Resistant (AFB) are not mandatory pathogens and for several years, the scientific community have not really shown interest in their study, but rather devoted to the study of TB epidemic. They were considered as saprophytic bacteria and their pathogenic potential are not recognized (Ziza and Desplaces, 2006). However, some mycobacteria such as *Mycobacterium liflandii* and *Mycobacterium fortuitum* produce toxins causing skin infections (Williamson et al., 2008; Kakou-Ngazoa et al., 2015). This is an extremely polymorphic bacterial genus that includes fast-growing species (less than 7 days), and slow growing species (7-60 days) and non-culturable outside animals species, *Mycobacterium leprae*, leprosy causing agent (Euzéby, 2010). Mycobacteria are divided into two major groups, they are complex tuberculosis and non-tuberculosis mycobacteria (NTM) also called environmental mycobacteria (mycobacteria of leprosy and atypical mycobacteria) (Inderlied et al., 1993; Caruso et al., 2009; del Rio Camacho et al., 2010). Although, molecular biology has helped to discover the existence of diversity in environmental mycobacteria (Domenech et al., 1994; Menendez et al., 2002; Williamson et al., 2008; Kakou-Ngazoa et al., 2015), culturing of species however, remains the most efficient means of knowing their physiology and their antibiotic sensitivity (Kubica et al., 1964; Trujillo et al., 2004). The most important ones are *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium abscessus* (Falkinham, 1996; Dailloux et al., 2010). The complex *M. avium, M. kansasii, M. chelonae* and *M. xenopi* are responsible for the majority of infections in the developed countries (Horsburgh, 1996), while *M. ulcerans* is responsible for ulcerative diseases in tropical and subtropical countries (Pedley et al., 2004). The distribution of commonly isolated species is in constant change in most countries studied and new species emerge (Martin-Casabona et al., 2004). They are part of the group of non-pigmented genes atypical mycobacteria such as *M. abscessus, M. chelonae, M. fortuitum* and *M. smegmatis* (Brown and Wallace, 1992).

Buruli ulcer, debilitating disease, is a serious public health problem. Almost all regions in Côte d'Ivoire are affected. The mode of transmission and environmental sources are unknown. To be able to understand the level of prevalence of skin infections in Côte d'Ivoire, it is important to identify species other than *M. ulcerans* that are involved. Given their large numbers, this study was undertaken with the aim to achieve the molecular characterization of potentially pathogenic environmental mycobacteria strains others than *M. ulcerans* from different aquatic environments in Côte d'Ivoire.

MATERIALS AND METHODS

Sites and scope of the study

The study was conducted at different sites considered to be Buruli ulcer endemic zones (Adiopodoumé, Tiassalé, Adzopé) and non-endemic zones (Agboville, Bouaké, Aghien) according to the national program against Buruli ulcer in Côte d'Ivoire. However, all biological part of this work was carried out at the Pastor Institute of Côte d'Ivoire.

Biological material

The biological material consisted of water and sediments sample from different studied environments.

Procedure

Samples were collected monthly, from June 2014 to June 2015. A total of 22 sampling stations were selected, 11 from the Lagoon of Aghien, 3 from Adzopé water retention. 2 stations were selected from Sokrogbo sites, Bodo and Adiopodoumé, respectively, 1 station each was selected, at the entrance of Agboville and Loka in Bouake water retention (Figure 1). The real prevalence of MU in the sampling site is unknown. But according the National reference Center of Buruli Ulcer (unpublished document), the rate of Buruli Ulcer confirmation in the region of the sampling site were: 62% Agboville; 56.36% Bouake, 30.77% Aghien and Adzopé.

Collection of water and sediment samples

The sediment samples were collected using dump Eckmann at big water points and a sampler at the banks (Schiavone and Coquery, 2011). A 5 L capacity bucket spout allowed drawing water at the bank of water points and a hydrological bottle 1.5 L capacity for drawing water far away from the banks. The sediments samples were put in sterile plastic bags and the water samples in sterile glass bottles of 1 L capacity. The samples were then kept refrigerated at 4°C during transportation, protected from light and taken to the laboratory within 24 h of sampling.

Culturing

In the laboratory, 500 g of each sediment and 100 mL of water sample was collected. In a Falcon tube 50 mL, 10 g of sediment were mixed with 40 mL of sterile distilled water following the method described by Kankya et al. (2011), slightly modified. After mixture of sediment and distilled sterile water, the supernatant was recovered in a new Falcon tube. Decontamination of water samples and recovered supernatant was carried out with cetylpiridium chloride (CPC) (Stinear et al., 2004), followed by neutralization with phosphate buffer.

The different culture medium: Loweinstein Jensen (LJ), Mac Conkey without purple crystal, ordinary agar and Middlebrook 7H10 agar was used for seeding. The samples in LJ and Middlebrook 7H10 agar were seeded in duplicate. One lot of each of them was packed in an aluminum foil for photoinduction test. The incubations were made at 23 and 37°C in the ovens. Daily observation were made until colonies were obtained.

An optical microscope (*Zeiss®*) was used for the observation of Acid-Alcohol Bacillus Resistant after Ziehl-Neelsen coloration (Barksdale, Kim. 1977). Classification of species was made according to the method described by Runyon and collaborators (1959). Biochemical identification of mycobacteria was done according to the method described by Metchock (1995). Briefly, for biochemical identification, the colonies obtained after culture was observed microscopically. The Acid-Alcohol Bacillus Resistant were cultured in the presence and absence of light on LJ medium for the test of photo-induction.

They were then seeded on ordinaire Agar at different temperatures (37, 42, 45 and 52°C), on LJ medium with 5% NaCl with the manitol test, the test in presence of sodium citrate and test in the presence of ferric ammonium.

Table 1. List of primers and detectors used.

Detector	Primers	Sequences (5'-3')	References
IS6110	MYCGEN-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Wilton and Cousin (1992)
	MYCGEN-R	TGCACACAGGCCACAAGGGA	
IS2404	IS2404 F	ATTGGTGCCGATCGAGTTG	Ross et al. (1997)
	IS2404 R	TCGCTTTGGCGCGTAAA	
	IS2404-probe	6 FAM-CACCACGCAGCATTCTTGCCGT-TAMRA	
KR	KR F	TCACGGCCTGCGATATCA	Fyfe et al. (2007)
	KR R	TTGTGTGGGCACTGAATTGAC	
	KR-probe	6 FAM-ACCCCGAAGCACTG-TAMRA	
MIRU1	MIRU1 F	GCTGGTTCATGCGTGGAAG	Stragier et al. (2005), Ablordey et al. (2005) and Hilty et al. (2006)
	MIRU1 R	GCCCTCGGGAATGTGGTT	
ST1	ST1 F	CTGAGGGGATTTCACGACCAG	
	ST1 R	CGCCACCCGCGGACACAGTCG	
VNTR-19	Locus 19F	CCGACGGATGAATCTGTAGGT	
	Locus 19R	TGGCGACGATCGAGTCTC	
VNTR-6	Locus 6 F	GACCGTCATGTCGTTCGATCCTAGT	
	Locus 6 R	GACATCGAAGAGGTGTGCCGTCT	

Molecular analysis of strains of mycobacteria

The DNA extraction was performed according to the method described by Ausubel et al. (1987). Molecular characterization was carried out using two types of PCR: Conventional PCR for the search of sequences IS6110 and MIRU-VNTR (Miru 1, Locus 6 VNTR19; ST1) and RT-PCR for the IS2404 sequences and ketoreductase (Kr). These analyses were done with all isolated colonies of Acid Alcohol Bacillus Resistant after culture. IS6110 and IS2404 were chosen to identify mycobacteria, MIRU-VNTR for typing the mycobacteria and the Kr sequence for the search of virulence factor.

Conventional PCR

The amplification of sequences IS6110 and Miru VNTR was made in the presence of specific primers for each sequence (Table 1). Each DNA extract (5 µL) was placed in the presence of 10X buffer, magnesium chloride (25 mM), DNTP 10 µM, copies of primers specific to each sequence (IS6110 and Miru VNTR), of 0.2 µl of DNA Taq polymerase (Hot Start Taq) in a final volume of 50 µL. The reaction mixture was incubated in a thermocycler of the type Gene Amp 9700 (Applied Biosystem®), according to the following schedule:IS6110 (94°C for 5 min; 94°C for 30 s; 62°C for 45 s; 72°C for 1 min 30; 72°C for 10 min and 4°C), Miru 1, Locus 6, VNTR 19 (95°C for 2 min; 94°C for 1 min; 58°C for 1 min; 72°C for 1 min; 72°C for 10 min and 4°C) ST1 (95°C for 2 min; 94°C for 1 min; 65°C for 1 min; 72°C for 1 min; 72°C for 10 min and 4°C).

The PCR products were separated by electrophoresis on agarose gel containing 2% ethidium bromide (ETB). The visualization was carried out under UV light from an automated system (Gel documention, Bio-Rad Laboratories USA).

Primers used

The sequences of the primers used are summarized in Table 1.

Real time PCR

Amplification of IS2404 and Kr sequences was performed in the presence of specific primers for each sequence (Table 1) in a final reaction volume of 50 µL. For markers used, a PCR –mixer of 20 µl containing water for injection (H_2O ppi), 5X buffer, magnesium chloride (25 mM), dNTP, a detector of 10µM, a Rox Dye, 0.2µl DNA Taq polymerase (Hot Start Taq) and 5 µl of our DNA extract. The reaction mixture was incubated in a STEP ONE PLUS device as follows : 50°C for 2 min; 95°C for 10 min; 95°C for 15 S; 60°C for 1 min.

The control strain was *M. ulcerans* (ITM9540) provided by the molecular biology platform of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. The negative control was sterile distilled water.

RESULTS

A total of 473 samples were collected, 251 water and 222 sediment left based on sampling sites (Table 2). Based on morphological and biochemical characteristics, 65 strains (13.74%) were isolated and 17 species were identified (26.15%). From the water samples collected, 43.07% of species were identified, and 59.92% from sediments. These identified species were distributed according to the collection sites. 32.35% of the identified species are found in the hyper endemic sites, against 19.35% of species from hypo endemic sites. The *M. peregrinum* species, like *M. smegmatis*, *M. peregrinum*, *M. immunogenicum*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum, M. abscessus, Mycobacterium* sp. were isolated in this study. *M. peregrinum* (13.84%) species was the most common in all sites, except in the sites of Bodo and Bouaké. The sediments are the most contaminated by *Mycobacteria* with 60% presence against 43.3% presence in water samples in hyper endemic areas. In hypo-endemic areas, water is the most contaminated with 53.57% presence against 43.24% in sediment samples. All species obtained were analyzed by PCR, focusing on IS2404 and Kr sequences. 9.23% of the isolated strains

Table 2. Samples collected according to sites and types.

Sample	Collection sites							
	Endemic sites				Non endemic sites			
	Adzopé	Adiopodoumé	Tiassalé		Agboville	Aghien	Bouake	Total
			Sokrogbo	Bodo				
Water	45	18	18	6	15	143	6	251
Sediments	16	18	18	6	15	143	6	222
Total	61	36	36	12	30	286	12	473

Table 3. Molecular characteristics of Identified mycobacteria species in each site.

Site	Samples collected	Mycobacteria species	IS6110	IS2404	Kr
Adzopé	Water	*M. smegmatis*	-	-	-
Adzopé	Water	*M. peregrinum*	+	-	-
Adzopé	Water	*M. mucogenicum*	+	-	-
Adzopé	Water	*M. mucogenicum*	-	+	+
Adzopé	Water	*M. mucogenicum*	-	+	+
Adzopé	Sediment	*M. peregrinum*	-	-	+
Abgoville	Sediment	*Mycobacterium sp.*	+	-	-
Abgoville	Sediment	*M. smegmatis*	-	-	+
Abgoville	Sediment	*M. immunogenicum*	-	-	-
Aghien	Sediment	*Mycobacterium peregrinum*	-	-	-
Aghien	Sediment	*Mycobacterium sp.*	+	-	-
Aghien	Water	*Mycobacterium sp.*	-	-	-
Aghien	Sediment	*Mycobacterium.peregrinum*	-	-	-
Sokrogbo	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	+	-
Sokrogbo	Water	*Mycobacterium sp.*	-	+	-
Sokrogbo	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	+	-
Sokrogbo	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	+	-
Bodo	Water	*M. mucogenicum*	-	+	-
Bodo	Water	*M. mucogenicum*	-	-	-
Adiopodoumé	Water	*M. peregrinum*	-	+	+
Adiopodoumé	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	+	-
Adiopodoumé	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	-	-
Adiopodoumé	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	+	+
Adiopodoumé	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	+	-
Adiopodoumé	Water	*Mycobacterium sp.*	-	+	-
Adiopodoumé	Sediment	*Mycobacterium sp.*	-	+	-

IS2404: Insertion sequence found in *Mycobacterium ulcerans* and other environmental mycobacteria; Kr: synthesizing enzyme mycolactone toxin found in *Mycobacterium* ulcerans and other MPM. ; (-): Negative result in the desired sequence; (+): Positive result in the desired sequence. Positive control DNA (ITM9540); negative control: (H_2O).

had ketoreductase genes (KR), these two sequences were found in the fast-growing isolated species. *M. peregrinum, M. mucogenicum* and *Mycobacterium* sp. (Table 3). All strains were identified by using Miru-VNTR. The isolated strains showed different profiles in the presence of the MIRU1, VNTR19, LOCUS 6 and ST1. Of The 4 markers used, the MIRU 1 is the most amplified sequence, and LOCUS 6 less amplified. None known profile was identified in this study (Table 4).

DISCUSSION

Mycobacteria species are a large group distributed in

Table 4. Molecular typing of identified mycobacteria species according to sites.

Site	Mycobacteria specie	MIRU1	VNTR19	ST1	LOCUS 6
Adzopé	*M. smegmatis*	2	nd	nd	nd
Adzopé	*M. peregrinum*	nd	nd	2	nd
Adzopé	*M.mucogenicum*	4	nd	nd	nd
Adzopé	*M. mucogenicum*	nd	2	nd	nd
Adzopé	*M. mucogenicum*	nd	nd	1	nd
Adzopé	*M. peregrinum*	nd	nd	nd	nd
Abgoville	*Mycobacterium* sp.	nd	nd	nd	nd
Abgoville	*M. smegmatis*	4	nd	nd	nd
Abgoville	*M. immunogenicum*	3, 4	nd	nd	nd
Aguien	*Mycobacterium peregrinum*	nd	2	nd	nd
Aguien	*Mycobacterium* sp.	nd	nd	2	nd
Aguien	*Mycobacterium* sp.	nd	2	2	nd
Aguien	*Mycobacterium peregrinum*	nd	2	nd	nd
Sokrogbo	*mycobacterium* sp.	nd	nd	nd	nd
Sokrogbo	*mycobacterium* sp.	nd	nd	nd	nd
Sokrogbo	*mycobacterium* sp.	nd	nd	nd	nd
Sokrogbo	*mycobacterium* sp.	nd	nd	nd	nd
Bodo	*M. mucogenicum*	nd	nd	nd	nd
Bodo	*M. mucogenicum*	nd	2	nd	1
Adiopodoumé	*M. peregrinum*	1	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium* sp.	1, 2	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium* sp.	1	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium* sp.	nd	nd	2	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium* sp.	nd	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium* sp.	4	nd	nd	nd
Adiopodoumé	*Mycobacterium* sp.	1	nd	nd	nd

nd: Not determined ; Miru1 (1 copy, 2 copies, 3 copies and 4 copies); VNTR 19 (2 copies); ST1 (1 copy and 2 copies) ; LOCUS 6 (1 copy); the negative control (H_20) has a negative outcome for all PCR.

various aquatic and terrestrial environments. Most are saprophytic, but some species are pathogens capable of infecting humans and animals (Von Reyn et al., 1993; Falkinham, 2009). Their no specific pathogenic characteristic differentiates them from mycobacteria causing tuberculosis. The objective of this study was to make the molecular characterization of environmental mycobacteria strains in Côte d`Ivoire. The high sediment contamination identified in the study highlight the fast growing of mycobacteria (Kirschner et al., 1992). The risk of transmission of cutaneous mycobacteriosis would therefore also be present in non-endemic sites like in the endemic locations as demonstrated by Williamson et al. (2008) in the case of Buruli ulcer. The prevalence rate of environmental mycobacteria was 13.74%. This rate was relatively lower than the 15.5% observed by Kankya et al. (2011) in Ouganda. Parashar et al. (2004) also observed variations in the effectiveness of decontamination methods depending on the origin of the samples. Indeed it is known that mycobacterial species do not have the same resistance to different decontamination procedures (Parashar et al., 2004). According to the classification of Runyon, all isolated mycobacteria belongs to the group of fast growing mycobacteria (Group IV). The following species have been identified in this study: species *M. peregrinum, M. chelonae, M. abscessus, M. mucogenicum, M. immunogenum, M. smegmatis, M. peregrinum* and *Mycobacterium* sp. The species *M. peregrinum* was the most common in all sites, except in the sites of Bodo and Bouaké. All these species identified in Cote d`Ivoire are responsible for skin ulcerations in some countries as reported by Zamarioli et al. (2008) and Buijtels et al. 2009. *M. chelonae*, is responsible for skin soft tissue infections as reported by Sniezek et al. (2003), *M. abscessus* responsible for skin and soft tissue infections with abscess formation or skin nodules, often appearing after trauma or surgical operation with infected materials (Griffith et al. 2007). Among the isolated strains, 20% were carriers of the gene IS2404, they include *M. mucogenicum, M. peregrinum* and *Mycobacterium* sp.

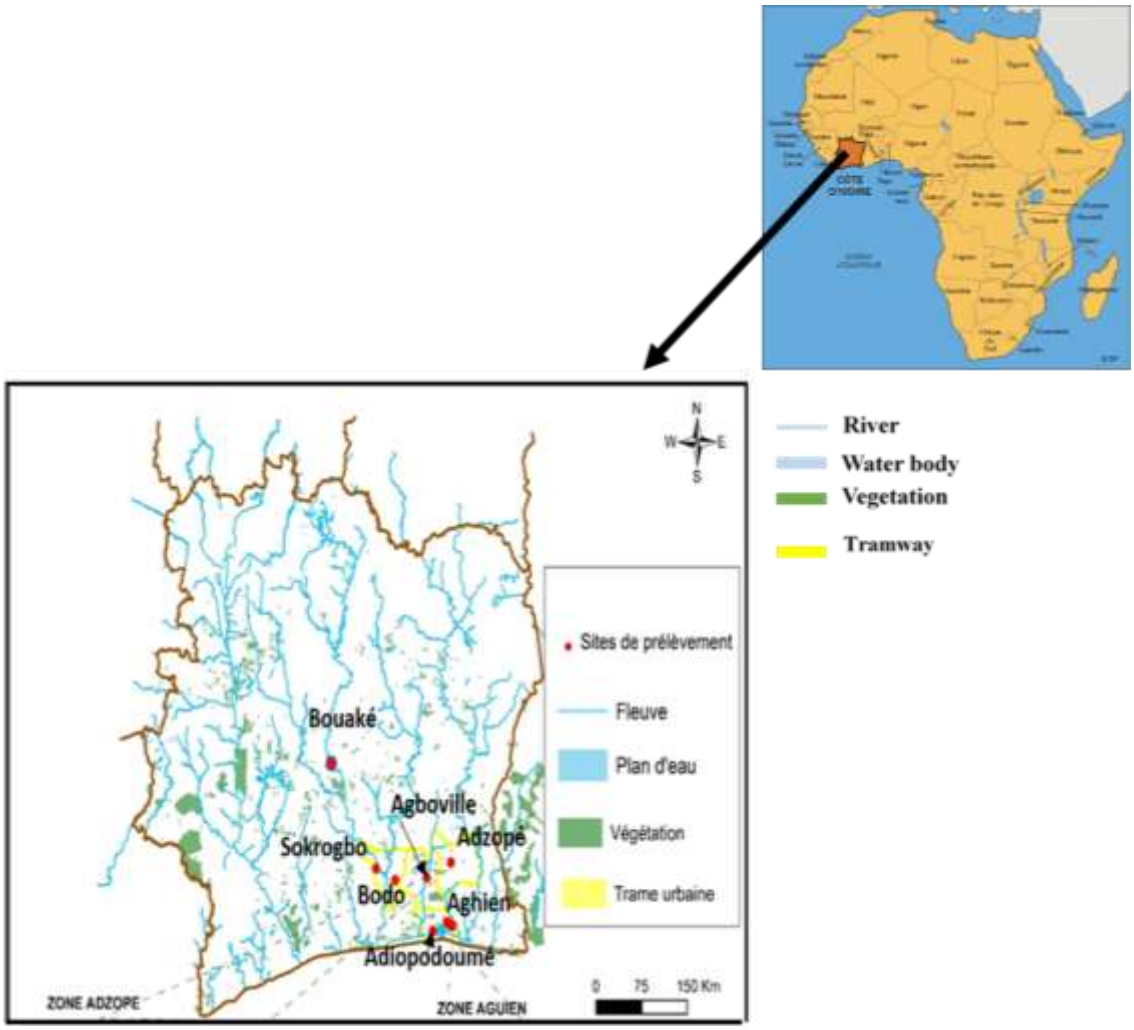


Figure 1. Sampling sites (Photo: Vakou Sabine, 2016).

This could imply the ability of these bacteria to cause skin ulcers in their isolated areas in Côte d'Ivoire. The sites of Bodo and Adzopé are known for their endemic zone to skin ulcers which has been attributed rightly or wrongly to *M. ulcerans* according to the National anti Buruli Ulcer Programe.

M. ulcerans is a slow-growing mycobacterium whose culture is often taken by default. The discovery in 1997 of the sequence of insertion IS2404 specific to *M. ulcerans* has been a catalyst for further research of the environmental germs (Ross et al. 1997). It shares this sequence with the other environmental mycobacteria such as *M. marinum, M. liflandii and M. pseudoshottsii* (Chemlal et al., 2002; Stragier et al., 2006). These slow growing mycobacteria would also be responsible for skin ulceration (Stragier et al., 2006). This sequence is an ideal for the diagnosis of Buruli ulcer (Portaels et al., 2009) could be good also for the diagnosis of Mycobacterial skin ulcerations.

Some differences were observed between the endemic sites and the non-endemic one. With the other level of contamination of water or sediments, the presence of *IS2404* gene was noticed only in the endemic sites. The Kr gene is most prevalent in endemic sites. This situation could be explain the sharing of genetic material between strains more frequently in endemic sites. But it could also be due to chance, in fact, Williamson et al. (2008), think that there would be no difference in the distribution of these genes between endemics and non-endemics sites. This study would be the first to reveal the existence of IS2404 gene in the fast-growing mycobacteria because according to previous studies, the IS2404 was the prerogative of slow growing mycobacteria (Chemlal et al., 2002; Stragier et al., 2006). In West Africa, Williamson et al. (2008), have also identified IS2404 gene in mycobacteria other than *M. ulcerans,* but they were the slow growing species. The ulcerations of Buruli ulcer are caused by one toxin, mycolactone (George et al., 1999).

A plasmid of 174 pb (pMUM001) present in the genome of the bacterium carries the polyketide synthetase genes (PKS), responsible for its' synthesis (Stinear et al., 2004, 2007). It was identified in other environmental mycobacteria that are slow growing, known to be mycolactone producing mycobacteria (Pidot et al., 2010). Results of this study also show its existence in the fast growing mycobacteria. Indeed, 9.23% of the isolated strains carry the ketoreductase gene (Kr), one of the enzymes involve in the synthesis of mycolactone according to Bali et al. (2006). Indeed, this enzyme would confirm the presence of the plasmid in the genome of the bacterium (Solange et al., 2015). Among the four specific markers, the MIRU 1 is the most amplified sequence, and LOCUS 6 the less amplified. No any known profile was identified in this study. These markers would be less appropriate to environmental isolated strains since they were tested only on samples from environmental and clinical strains (Stinear et al., 2007).

Conclusion

The results of this study highlight the potential risk of contamination in humans especially people in permanent contact with the environment. These species discovered, would be responsible for ulcerations in Côte d'Ivoire, which could explain the very high level of endemicity. It is therefore important to identify the sequences of these species in order to set up appropriate diagnostic methods. This study is just the first step, we want to understand the different skin infections encountered in Côte d'Ivoire. This will help to better diagnose patients suffering from skin infections other than Buruli ulcer and to consider strategies and means of protection of the population against all mycobacterioses by breaking the epidemiological chain.

In perspective, it would be good to continue studying the rapidly growing mycobacteria to determine their involvement in cutaneous ulcerations. The sequencing of the genes Kr and IS2404 isolated in the strains of this study for their eventual relationship with *M. ulcerans* could help for a better comprehension of the affection.

Conflict of interest

The authors declared that there is no conflict of interests.

REFERENCES

Ablordey A, Hilty M, Stragier P, Swings J, Portaels F (2005) Comparative Nucleotide Sequence Analysis of Polymorphic Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Mycobacterium ulcerans.* J. Clin. Microbiol. 43**(**10):5281-5284.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York.

Bali S, Weissman KJ (October 2006). "Ketoreduction in Mycolactone Biosynthesis: Insight into Substrate Specificity and Stereocontrol from Studies of Discrete Ketoreductase Domains in vitro". Chem. BioChem. 7(12):1935-1942.

Barksdale L, Kim KS (1977): Mycobacterium. Bacteriol. Rev. 41:217

Buijtels PC, van der Sande MA, de Graaff CS, Parkinson S, Verbrugh HA, Petit PL (2009). Nontuberculous mycobacteria, Zambia. Emerg. Infect. Dis. 15:242-249.

Brown, Wallace (1992), Skin, soft tissue, and bone infections due to Mycobacterium chelonae: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. J. Infect. Dis. 166(2):405-12.

Caruso GFM, Passàli L, Salerni G, Molinaro M, Messina (2009). Head and neck mycobacterial infections in pediatric patients. Int. J. Pediatr. Otorhino laryngol. 73(1):38-41.

Chemlal K, Huys G, Laval F, Vincent V, Savage C, Gutierrez C, Laneelle MA, Swings J, Meyers WM, Daffe M, Portaels F (2002) Characterization of an unusual *Mycobacterium*: a possible missing link between *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. J. Clin. Microbiol. 40(7):2370-2380.

Clovice K, Adrian M, Berit D, Musso M, John O-A, Eystein S, James O, Vigdis E, Tone BJ (2011). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: Public Health significance. BMC Public Health 11(1):1471-2458.

Dailloux M, Laurain C, Weber R, Hartemann P (2010). Water and non tuberculous mycobacteria. Water Res. 33:2219-2228.

del Rio Camacho G, Soriano Guillén L, Flandes Aldeyturriaga J,. Hernández García B, Bernácer Borja M (2010). Endobronchial atypical mycobacteria in an immunocompetent child. Pediatr. Pulmonol. 45(5):511-513.

Domenech P, Menendez MC, Garcia MJ (1994). Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. FEMS Microbiol. Lett. 116(1):19-24.

Euzéby JP (2010). Techniques de diagnostiques en mycobactériologie. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. Available at: http:// www.mycobacterie.fr.

Falkinham JO (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9:177-215

Falkinham JO (2009). Surrounded by mycobacteria: Non tuberculous mycobacteria in the human environment. J. Appl. Microbiol. 107:356-367.

Fyfe JA, Lavender CJ, Johnson PD, Globan M, Sievers A, Azuolas J, Stinear TP (2007). Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of Mycobacterium ulcerans in clinical and environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 73(15):4733-4740.

George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, Small PL (1999). Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. Science 283:854-857.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, (2007). An official ATS/IDSA statement : Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med 175:367-416.

Hilty M, Yeboah-Manu D, Boakye D, Mensah-Quainoo E, Rondini, S, Schelling E, Ofori-Adjei D, Portaels F, Zinsstag J. Pluschke G (2006). Genetic diversity in *Mycobacterium ulcerans* isolates from Ghana revealed by a newly identified locus containing a variable number of tandem repeats. J. Bacteriol. 188:1462-1465.

Horsburgh CR. Jr. (1996). Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Semin. Respir. Infect. 11(4):244-251

Inderlied CB, Kemper CA Bermudez LM (1993). The Mycobacterium avium complex. Clin. Microbiol. Rev. 6(3):266-310.

Kakou-Ngazoa E. Solange, Coulibaly N. David, AkaNguetta, Vakou Sabine Aoussi Serge and Dosso Mireille (2015) Clonality of *Mycobacterium ulcerans* by Using VNTR-MIRU Typing in

IvoryCoast (Côte d'Ivoire), West Africa. Int. J. Trop. Dis. Health 7(4):163-171.

Kirschner RA Jr, Parker BC, Falkinham JO III (1992): Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. Am. Rev. Respir. Dis. 145:271-275.

Kubica GP, Kaufmann AJ, Dye WE (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.

Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, Manceau AL, Mahaza C, Carbonnelle B (2002). Aquatic insectsas a vector for *Mycobacterium ulcerans*. Appl. Environ. Microbiol. 68:4623-4628

Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint-Andre´ JP, Robert R, et al. (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.

Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J (2004). Non-tuberculous mycobacteria : patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 8:1186-1193.

Menendez MC, Garcia MJ, Navarro MC, Gonzalez-y-Merchand JA, Rivera-Gutierrez S, Garcia-Sanchez L (2002). Characterization of an Rrna operon (*rrn*B) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species: Implications for the classification of mycobacteria. J. Bacteriol. 184(4):1078-1088.

Metchock B Nolte F. (1995): Mycobacterium. In: Murray PR,. Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 400-437

Parashar D, Chaulan DS., Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SVS, Katoch VM. (2004). Optimisation of procedures for isolation of mycobacteria from soil land waters amples obtained in northern India. Appl. Environ. Microbiol. 70:3751-3753

Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufouret A Cotruvo JA (2004). Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public healthconsequences, monitoring and management. S. Pedley, J.Bartram, G. Rees, A. Dufour and J. A. CotruvoEds. London, in World Health Organization titles with IWA Publishing. 1:1-229.

Pidot SJ, Asiedu K, Ka¨ser M, Fyfe JAM, Stinear TP (2010) Mycobacterium ulcerans and Other Mycolactone-Producing Mycobacteria Should Be Considered a Single Species. PLoS Negl. Trop. Dis. 4(7):e663.

Portaels F, Silva MT, Meyers WM (2009) Buruli ulcer. Clin Dermatol. 27:291-305.

Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, Stinear T, Hayman JA, Veitch MG, Robins-Browne RM (1997). *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative diseases. Appl. Environ. Microbiol. 63:4135-4138.

Runyon EH (1959): Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. N. Am. 43:273-290

Schiavone S, Coquery M (2011). Guide d'échantillonnage et de pré- traitement des sédiments en milieu continental pour les analyses physico-chimiques de la DCE. *Cemagref*, p24.

Sniezek PJ, Graham BS HB, Busch ER, Lederman ML, Lim K Poggemyer (2003). Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. Arch. Dermatol. Res. 139(1):629-634.

Solange KN, Coulibaly N, Sabine VA, Kouame KO, Serge AO, Constance KM, Helene KO, Julien AK, Raymond NG, Mireille DO (2015). Virulence factors expressed by *Mycobacterium ulcerans* strains: Results of a descriptive study Afr. J. Microbiol. Res. 9(28):1745-1751.

Stinear T, Ford T, Vincent V (2004). Analytical methods for the detection of waterborne and environmental pathogenic mycobacteria, p. 55-73. In. Pedley S, Bartram J, Rees, Dufour A, Cotruvo J (ed.), Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management. IWA Publishing, London, United Kingdom.

Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, (2007). Reduction evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. Genome Res. 17:192-200.

Stragier P, Ablordey A, Meyers WM, Portaels F (2005) Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units. J. Bacteriol. 187:1639-1647.

Stragier P., Ablordey A., Bayonne L. M., Lugor Y. L., Sindani I. S., Suykerbuyk P., Wabinga H., Meyers W. M., Portaels F. (2006) Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* isolates from Africa. Emerg. Infect. Dis. 12:844-847.

Trujillo M, Velazquez E, Kroppenstedt RM, Schumann P, Rivas R, Mateos PF (2004). *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. International J. Syst. Evol. Microbiol. 54(5):1459-1463.

Von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, Arbeit RD, Maslow JN, Barber TW (1993): Isolation of Mycobacterium avium complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. J. Clin. Microbiol. 31:3227-3230.

Winthrop KL, Abrams M. Yakrus MA, Schwartz I, Ely J, Gillies D, (2002). An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. New Engl. J. Med. 346(18):1366-1371.

Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, Beachboard DC, Kimbirauskas RK, et al. (2008) Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli Ulcer Endemic and Non-Endemic Aquatic Sites in Ghana. PLoS Negl. Trop. Dis. 2(3):e205.

Wilton S, Cousins D. (1992) Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. PCR Methods Appl. 1:269-273

Ziza JM, Desplaces N (2006). Infections ostéoarticulaires à mycobactéries atypiques. Revue du rhumatisme 73: 394-400.

Zamarioli LA, Coelho AG, Pereira CM, Nascimento AC, Ueki SY, Chimara E (2008). Descriptive study of the frequency of non tuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of Sao Paulo, Brazil. J. Bras. Pneumol. 34(8):590-594.

Frontiers in Environmental Microbiology
2016; 2(6): 28-33
http://www.sciencepublishinggroup.com/j/fem
doi: 10.11648/j.fem.20160206.11
ISSN: 2469-7869 (Print); ISSN: 2469-8067 (Online)

Phenotypic Profile of Isolated Strains of Environmental Mycobacteria in the Buruli Ulcer Endemic Zones in Cote d`Ivoire (2015)

Vakou N. Sabine[1, 2, *], Coulibaly Kalpy J.[1, 2], Aka N'guetta[3], Kakou Ngazoa E. Solange[4], Coulibaly N'golo D.[1], Djaman Allico[1, 2], Dosso Mireille[1]

[1]Department of Environment and Health, Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire

[2]Faculty of Biosciences, University of Felix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire

[3]Departement of Bacteriology and Virology, Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire

[4]Departement of Technology, Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire

Email address:

vsalger@yahoo.fr (Vakou N. S.), jc_kalpy@yahoo.fr (Coulibaly K. J.), ngazoa_solange@yahoo.fr (Aka N'guetta), aka_nguetta@yahoo.fr (Kakou N. E. S.), david79tr@yahoo.fr (Coulibaly N'golo D.), djamanj@yahoo.fr (Djaman A.), mireilledosso@yahoo.fr (Dosso M.)

[*]Corresponding author

To cite this article:

Vakou N. Sabine, Coulibaly Kalpy J., Aka N'guetta, Kakou Ngazoa E. Solange, Coulibaly N'golo D., Djaman Allico, Dosso Mireille. Phenotypic Profile of Isolated Strains of Environmental Mycobacteria in the Buruli Ulcer Endemic Zones in Cote d`Ivoire (2015). *Frontiers in Environmental Microbiology.* Vol. 2, No. 6, 2016, pp. 28-33. doi: 10.11648/j.fem.20160206.11

Received: August 20, 2016; **Accepted**: November 2, 2016; **Published**: November 30, 2016

Abstract: Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are microorganisms of the genus Mycobacterium. They are widely present in the environment (soil, water, sediment, aquatic plants ....). They are responsible for many infections as reported by several authors. The purpose of this study is to isolate and identify mycobacteria in the water and sediments found in hyperendemic areas and hypoendemic of Buruli ulcer. A total of 473 samples were obtained. As follows, 251 samples from water and 222 from sediment distributed according to sampling sites. The sample decontamination was performed with Cetylpiridium Chloride (CPC), followed by neutralization with phosphate buffer. A total of 8 species (12.3%) were identified in our study. 50.77% of species identified were found in hyper endemic zones against, 49.23% of species at the hypo-endemic zones. *Species like M. peregrinum, like M. smegmatis, like M. peregrinum, M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus, M. sp*. were isolated in this study. The species *M, peregrinum* (13.84%) was the most common in all sites, except in the sites of Bodo and Bouaké. This study reveals the presence of fast growing mycobacteria such as *M. peregrinum* in water and in sediment in Côte d`Ivoire, which represents the potential risk of contamination in humans especially in people who are in permanent contact with water.

Keywords: Mycobacterium, Buruli Ulcer, Non-tuberculous Mycobacteria, Culture

1. Introduction

Mycobacteria are found everywhere in the environment like: soil, water, aerosols, plants, aquatic animals ... They cause lung, skin or lymph infections [1-5]. They are not among serious pathogens, therefore no serious attention are being paid to by the scientific community, who rather committed more attention to tuberculosis epidemic. These are bacteria that appear red on blue background according to *Ziehl-Neelsen:* they are called Acid- Alcohol Resistant Bacillus (BAAR) [6]. This is an extremely polymorphic bacterial genus, they include fast-growing species (less than 7 days), and slow growing species (7-60 days) and non-cultivable species outside animals, *Mycobacterium leprae*, leprosy agent [7]. Mycobacteria are grouped into two major groups namely *tuberculosis complex* and *nontuberculous mycobacteria* (NTM) also called environmental mycobacteria (mycobacteria of leprosy and atypical

mycobacteria) [8-10]. The common laboratory protocols that are used to isolate mycobacteria in clinical samples are becoming less suitable to environmental mycobacteria [11]. Culturing, however, remains the most effective way to describe species, understand their physiology and to test their sensitivity to antibiotics [12, 13]. There are currently more than hundreds of atypical mycobacteria species [14]. The most common are *M. avium, M. intracellulare, M. kansasii, M. xenopi, and M. abscessu*s [15, 16]. The distribution of commonly isolated species is in constant change in most countries where studies have been carried out and new species emerged [17]. They would be part of non-pigmented genes atypical mycobacteria group such as *M. abscessus, M chelonae, M fortuitum, M. smegmatis* [18]. The Buruli ulcer (BU), caused by *Mycobacterium ulcerans*, is a real public health problem in Ivory Coast, almost all areas are affected. The mode of transmission and environmental sources are unknown. To be able to understand the level of prevalence of mycobacterial infections, it is very important to identifier the species involved in *ulcerations*. The main objective of this study is to isolate and identify the *mycobacteria* in water and in sediments in Buruli Ulcers hyper endemic and hypo endemic zones in Ivory Coast.

2. Materials and Methods

2.1. Sites and Study Environment

The study was conducted in sites considered to be BU hyper endemic areas (Adiopodoumé, Tiassalé (Sokrogbo and Bodo), Adzopé) and hypo-endemic areas (Agboville, Bouaké (Loka) Aghien) according to the National Programme on fight against BU in Côte d`Ivoire (Fig 1). The Bacteriological part of this study was carried out at the Pasteur Institute of Côte d`Ivoire.

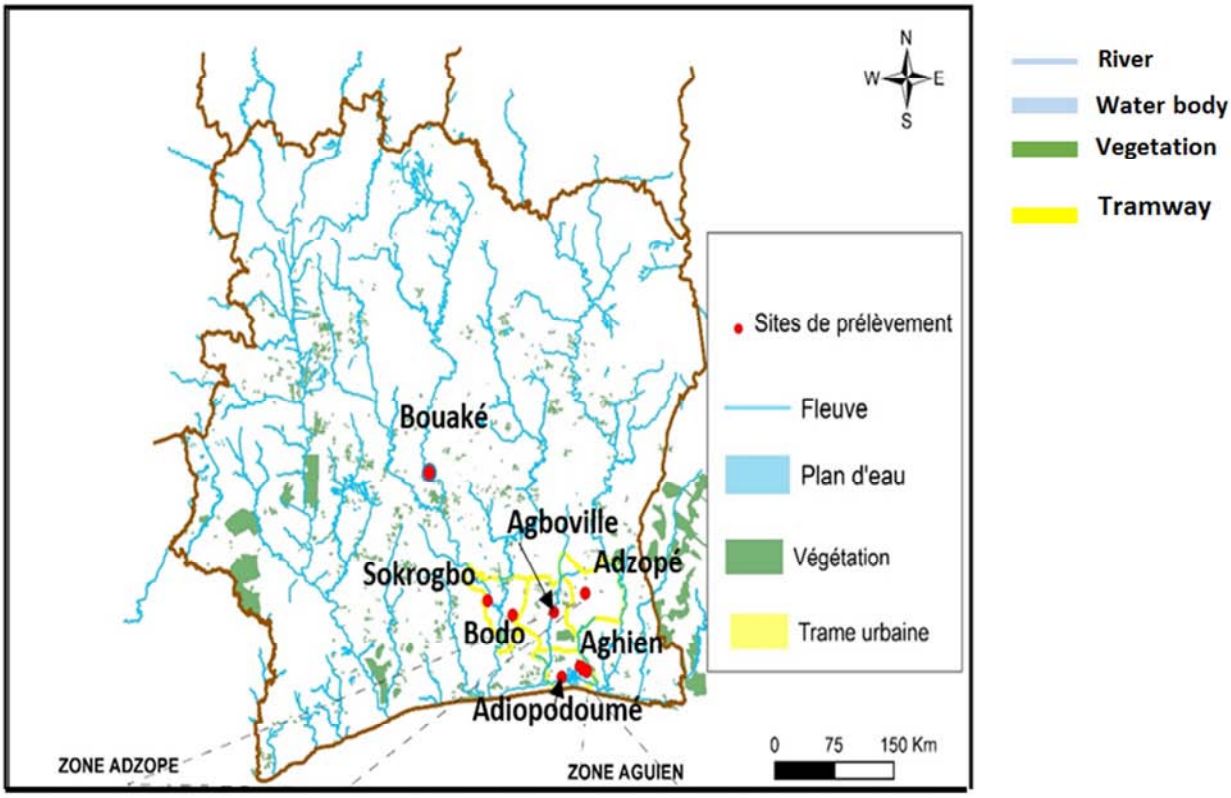


Figure 1. *Sampling sites.*

2.2. Biological Material

The biological material consisted of samples from water and sediment obtained from different sites.

3. Methodology

3.1. Sample

A monthly sample was taken from June 2014 to June 2015. A total of 22 sites were selected, as follows 11 Aghien Lagoon, 3 swamps in Adzopé. 2 sites each were selected in Sokrogbo, Bodo and Adiopodoumé respectively. 1 site was selected at the entrance of Agboville town and on swamp in Loka at Bouaké.

The sediment samples were collected using dump Eckmann at big water points and a sampler at the banks [19]. A 5 liter capacity bucket spout allowed to draw water at the bank of water points and a hydrological bottle 1.5L capacity for drawing water far away from the banks. The samples were then kept refrigerated at 4°C during transportation, protected from light and taken to the laboratory within 24 hours of sampling.

3.2. Culturing

3.2.1. Sediments

In the laboratory, 500g of each sediment sample were collected. In a Falcon tube of 50 mL capacity, 10g of sediment were mixed with 40 mL of sterile distilled water using the method described by [20] slightly modified. After mixture of the sediment and distilled sterile water, the supernatant was recovered in a new Falcon tube. Decontamination of supernatant recovered was carried out with the chloride Cetylpiridium (CPC) [21] followed by neutralization with phosphate buffer.

3.2.2. Waters

100 mL of water drawn were centrifuged at 13,000 rpm for 20 min. Decontamination of the pellet was carried out with the chloride Cetylpiridium (CPC) [21], followed by neutralization with phosphate buffer.

3.2.3. Seeding

The different culture medium: Loweinstein Jensen (LJ), Mac Conkey without crystal violet, ordinary agar and Middlebrook 7H10 were used for seeding. Samples in LJ and Middlebrook 7H10 agar were seeded in duplicate. 1 lot of each of them was packed in aluminum foil for the photo induction test.

3.2.4. Incubation

Incubations were made at 23°C and 37°C in ovens on special racks, tilted. The tubes were closed until after evaporation of the liquid, the medium have to be dry but not dried out so that mycobacteria can grow. Agar should be incubated at least 8 weeks and up to 12 weeks [22]. **A** daily observation was made until colonies were formed.

3.3. Identification and Classification

The presence of mycobacteria was confirmed by *Ziehl Neelsen* coloration. An optical microscope (*Zeiss®*) was used for the observation of Acid- Alcohol Resistant Bacillus after Ziehl-Neelsen coloration [23]. Classification of species was made according to the method described by Runyon and collaborators [24]. According to the classification of Runyon, the following characteristics were tested: the incubation temperature, the growth time (- 8 days for rapidly growing mycobacteria, + 8 days for slow growing mycobacteria) colonies morphology, observed under the microscope, either eugonic colonies (rough, progressive development in colonies of up to 1 cm in diameter) type "R" or "S" or dysgonic colonies (smooth, always remaining small colonies of around 1 millimeter (mm) in diameter, they are sometimes embedded in agar) type "R" or "S" of photochromogens (colonies whose pigmentation occurs as a result of exposure to light) of scotochromogens (colonies whose pigmentation occurs in the dark), the achromogens (non-pigmented colonies), also according to the pigmentation, chamois beige, yellow, orange, pink or red or not [7].

4. Results

A total of 473 samples were obtained distributed as follows, 251 from water and 222 from sediment collected from several sites (Table 1).

Table 1. *Number of samples per sampling site.*

SAMPLES COLLECTION SITE								
	hyper endemic site				hypo endemic site			
	Adzopé	Adiopodoumé	Tiassalé		Agboville	Aghien	Bouake	TOTAL
			Sokrogbo	Bodo				
Eaux	45	18	18	6	15	143	6	251
Sédiments	16	18	18	6	15	143	6	222
TOTAL	61	36	36	12	30	286	12	473

All decontaminated samples were cultured and observed on a daily basis up to colonies development. After pigmentation and microscopic observation of colonies, 65 were BAAR positive (13.74%), 408 were BAAR negative (86.25%). Of the 65 identified as BAAR positive, 34 were from hyper endemic sites (52.3%) and 31 from hypo-endemic sites (47.69%). According to colonies appearance, 8 colonies were Rough (R) (12.3%), they are from Aghien and Adzopé sites and 57 colonies were smooth (S) (87, 69%). None of the colonies have both rough and smooth appearance. Based on pigmentation of colonies to light and dark, no strain was scotochromogenic, 4 were photochromogenic, they are from Adzopé sites, Bodo, Agboville and Bouake (loka) and 61 were non Chromogenic. According to the growth of colonies in the presence of the substrate used, the addition of NaCl to LJ medium was equally favorable to the growth of mycobacteria likewise LJ without NaCl, 76.92% of strains were Tween 80 negative.

Based on the characteristics of culture, morphological appearance and biochemical, isolated strains were all rapidly growing mycobacteria. No slow growing mycobacteria have been isolated. A total of 8 species (12.3%) were identified in our study. About 50.77% of identified isolated strains were from the hyper endemic sites as against, 49.23% of species from the hypo-endemic sites. Species like *M. peregrinum species, like M. smegmatis, like M. peregrinum, M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus, M. sp*. were isolated in this study. The specie *M. peregrinum* (13.84%) was the most common in all sites, except in the sites of Bodo and Bouaké.

In the hyper endemic sites sediments were the most

contaminated by mycobacteria with 60% against 43.3% in water samples. In hypo-endemic areas, water sample was the most contaminated with a rate of 53.57% against 43.24% in sediments sample (Table 2).

Table 2. *Number of isolates per site according to the type of sample.*

	Number of isolated strains per sample							
	Sites hyper endémiques				**Site hypo endémiques**			**TOTAL**
	Adzopé N(%)	**Adiopodoumé N(%)**	**Tiassalé N(%)**		**Aghien N(%)**	**Agboville N(%)**	**Bouaké N(%)**	
			Sokrogbo	**Bodo**				
Eaux	5 (16, 66)	3 (10)	3(10)	2 (6,66)	12 (40)	3 (10)	0	28 (43, 07)
Sédiments	7 (20)	4 (11, 42)	6 (17,14)	4 (11,42)	11 (31, 4)	4 (11, 42)	1	37 (59, 92)
TOTAL	12 (18, 46)	7 (10, 76)	9(13,84)	6(9,23)	23(35, 38)	7 (10, 7)	0	65

The identified species in our study were classed according to the type of sample. From the hyper endemic zone Adzopé site has the most contaminated sample with a rate of 66.6% while from hypo-endemic zone Agboville site has the most contaminated sample.

5. Discussion

In this study, 473 samples were analyzed. The most contaminated sample by the presence of mycobacteria with 60% was sediments against 43.3% for water samples in hyper endemic areas. In hypo-endemic areas, water sample was the most contaminated with a rate of 53.57% against 43.24% in sediment. However other studies, such as Mohammad *et al*. found the rate of isolated mycobacteria in water to be lower than in soils [25]. This could be explained by the presence of parameters favorable to the growth of mycobacteria in the sediment [26]. The environmental mycobacteria prevalence rate was 13.74%. This rate was relatively lower than the 15.5% observed by Kankya *et al*. [20] in Uganda and 18.2% reported par Mohammad *et al*. after treatment with 3% SDS combined with 1% NaOH [25]. This result could be explained due to the utilization of different decontaminating compounds having variables effects on the growth of mycobacteria [27]. The most suitable method used in this study was the 0.1% CPC added to 0,067 M phosphate buffer pH 6.8. Indeed, there are several decontamination methods available [28]. The treatment with Cetylpyridium chloride (CPC) detergent stimulates the growth of many NTM with low contamination by interfering bacteria [21]. The nontoxic nature of the compound and its bactericidal properties makes it an exceptionally versatile and valuable disinfectant. However, the efficacy of decontaminants depends on their concentration and contact time with sample [29]. These treatments can convert viable living cells into a state of viable bacteria but non-culturable [27]. The concentration and decontamination stages often result to loss of culturable mycobacteria, and the culture medium to be used are still relatively selective because they can't reveal some non-culturable organisms [30]. Thus Pickup *et al*. noted that several species of NTM in the river Tall (GB) could not be isolated by culture [31]. Parashar *et al.* also observed variation in the effectiveness of decontamination methods based on the origin of the samples [32]. Indeed it is known that mycobacterial species do not have the same resistance to different decontamination procedures [32]. All 65 isolated strains were Bacillus acid-alcohol resistant (BAAR). However these BAAR are also found in other *genus*, not well described *Dietzia, Gordona and Tsukamurella* [7] [33, 34]. These procedures therefore represent the first step in the identification of mycobacteria, however less specific concerning the Mycobacterium genus [35]. Identifying of species therefore requires additional biochemical tests on growth [7] in the presence of certain compounds, and resistance to some chemicals.

Concerning the colonies observed, 87.69% of the strains were Smooth (S), against 12.30% R (rough). They were mostly dysgonic colonies and not pigmented. According to the Runyons classification, all isolated mycobacteria belong to the group of rapidly growing mycobacteria (group IV). Several studies have also revealed the presence of rapidly growing mycobacteria in soil [11]. The following species have been identified in our study *M. peregrinum, M. chelonae, M. abscessus, M. mucogenicum, M. immunogenum, like M. smegmatis, like M. peregrinum and M. sp*. In our study a prevalence rate of 50.77% was observed, in the BU hyper endemic areas against 49.23% in the BU hypo endemic areas. *M. peregrinum* specie (13.84%) was more frequent in all the sites, except in Bodo and Bouaké. Tsukamura *et al.* found that *M. fortuitum* specie was the most common in soil samples [36]. The epidemiology of NTM would be different from one country to another and from one continent to the other. For example *M. xenopi* appeared to be the second mycobacterium isolated in Europe and the first in some areas, like in the southeast of Britain, while the same specie represent less than 0.01% of isolated MNT in the US [1, 17, 37].

All these species identified in Côte d`Ivoire causes skin infection in some countries according to report, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, are responsable for skin infections, *M. abscessus* are responsable for skin and soft tissue infection with formation of abscess or skin nodules, often appearing after trauma or surgical operation done with infected material [1, 3, 38, 39] and various other infections caused by *M. lentiflavum and*, *M. intracellulare* in Zambia [40]. There could be a relationship between the species present in the environment and the high endemic ulcerations in Côte d`Ivoire. This study revealed the presence of rapidly growing mycobacteria such as *M. peregrinum* in water and sediment.

6. Conclusion

This study describes the potential risk of contamination in

humans especially those who are constantly in contact with the environment. The risk of transmission of cutaneous mycobacteriosis would be equally present in hypo-endemic area as well as in hyper endemic areas like Williamson *et al.* reported in the case of Buruli Ulcer [41]. Further studies should be carried out in other to explain the conditions for spreading of these species in the environment.

References

[1] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ Jr, Winthrop K, An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of non tuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 367-416.

[2] Winthrop Kevin L, M. D, Abrams Marcy, R. N, Yakrus Mitchell, M. S, M. P. H, Ira Schwartz, R. N, M. P. H, Janet Ely, B. A, Gillies Duncan, B. A, And Vugia Duc J, M. D, M. P. H. (2002). An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. New England Journal of Medicine 346 (18): 1366-1371.

[3] Sniezek P. J, Graham B. S, Busch HB, Lederman ER, Lim ML, Poggemyer K, Kao A, Mizrahi M, Washabaugh G, Yakrus M., Winthrop K. (2003). Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. Archives of Dermatological Research 139 (1): 629-634.

[4] Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre J P, Kouakou H, Legras P, Manceau A L, Mahaza C, Carbonnelle B, Aquatic insects as a vector for Mycobacterium ulcerans. Appl. Environ. Microbiol. 68,4623-4628 (2002).

[5] Marsollier L., Stinear T, Aubry J, Saint André JP, Robert R, Legras P, Manceau AL, Audrain C, Bourdon S, Kouakou H, Carbonnelle B (2004) Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by Mycobacterium ulcerans in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. App Env. Microbiol 70: 1097–1103.

[6] Ziza Jean Marc et Desplaces Nicole (2006) Infections ostéoarticulaires à mycobactéries atypiques. Revue du rhumatisme, 73: 394-400.

[7] Euzéby J. P. (2010) Techniques de diagnostiques en mycobactériologie. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire http:// www.mycobacterie.fr.

[8] Inderlied C. B, Kemper C. A et Bermudez L. M (1993). The Mycobacterium avium complex. Clinical Microbiology Reviews 6 (3): 266-310.

[9] Caruso G, Passàli F. M, Salerni L, Molinaro G. et Messina M. (2009). Head and neck mycobacterial infections in pediatric patients. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 73 (1): 38-41.

[10] Del Rio Camacho G, Soriano Guillén L, Flandes Aldeyturriaga J, Hernández García B et Bernácer Borja M. (2010). Endobronchial atypical mycobacteria in an immunocompetent child. Pediatric Pulmonology 45 (5): 511-513.

[11] Chilima BZ, Clark IM, Floyd S, Fine PE, Hirsch PR (2006). Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District Northern Malawi. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2243-2250.

[12] Kubica, G P, Kaufmann A J, and Dye W E 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.

[13] 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.

[14] 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 goodie 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.

[15] Falkinham JO III: Epidemiology of infection by non tuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996, 9: 177-215.

[16] Dailloux M, Laurain C, Weber R, Hartemann P: Water and non tuberculous mycobacteria. Water Res 2010, 33:2219-2228.

[17] Martín-Casabona N, Bahrmand A R, Bennedsen J, Østergaard Thomsen V, Curcio M, Fauville-Dufaux M, Feldman K, Havelkova M, Katila M-L, Köksalan K, Pereira M F, Rodrigues F, Pfyffer G E, Portaels F, Rosselló Urgell J, Rüsch-Gerdes S, Spanish Group for Non-Tuberculosis Mycobacteria, Tortoli E, Vincent V, Watt B (2004). Non-tuberculous mycobacteria : patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 8: 1186-1193.

[18] Brown et Wallace, 1992, Skin, soft tissue, and bone infections due to Mycobacterium chelonae chelonae: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin, J Infect Dis. 1992 Aug; 166 (2): 405-12.

[19] Schiavone S, Coquery M (2011). Guide d'échantillonnage et de pré- traitement des sédiments en milieu continental pour les analyses physico-chimiques de la DCE. Cemagref, 24 p.

[20] Clovice Kankya, Adrian Muwonge, Berit Djønne, Musso Munyeme, John Opuda-Asibo1, Eystein Skjerve, James Oloya1, Vigdis Edvardsen and Tone B Johansen, 2011, Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: Public Health significance BMC Public Health, 11: 320 1471-2458.

[21] Tim Stinear, Ford T, and Vincent V 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.

[22] Carbonnelle B, Dailloux M., Lea L, Jeanne M., Chantal P, Cahier de formation mycobactéries, mycobacterioses, 2003.

[23] Barksdale L. and Kim K. S. (1977): Mycobacterium. Bacteriol. Rev. 41: 217.

[24] Runyon E H (1959): Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. N. Amer. 43: 273-290.

[25] Mohammad Rahbar, Aboulfathlamei, Homayoon Babazadeh and Shoherh Afsharyavari, 2010, Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran, African journal of Biotechnology, vol 9(24), pp. 3618-3621.

[26] Kirschner RA Jr, Parker BC, Falkinham JO III: Epidemiology of infection by non tuberculous mycobacteria. Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Mycobacterium scrofulaceum in acid, brown-water swamps of the south eastern United States and their association with environmental variables. Am Rev Respir Dis 1992, 145: 271-275.

[27] Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, et al. Reduction evolution and niche adaptation inferred from the genome of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer. Genome Res. 2007; 17: 192-200.

[28] Kamala T, Paramasivan C N, Herbert D, Venkatesan P, and Prabhakar R. 1994. Evaluation of procedure for isolation of non tuberculous mycobacteria from soil and water. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1021–1024.

[29] Hunter P, J. Lee, G. Nichol, M. Rutter, S. Surman, L. Weldon, D. Biegon, T. Fazakerley, F. Drobnewski, and P. Morrell 2001 fate of mycobacterium avium complex in drinking water and distribution system. Mallow, Buckinghamshire: foundation for water research; 2001. Reporty no; dw10815.

[30] R. M. Atlas and R. Bartha (1997). Microbial ecology: fundamentals and applications. Benjamin. Cummings Science, New York.

[31] RW. Pickup, G. Rhodes Arnott S., Sidi-Boomedine K., Bull TJ., Weightman A., Hurley M., et Hermon-Taylor J. (2005). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2130-2139.

[32] Parashar D., Chaulan DS., Sharma VD., Chauhan A., Chauhan SVS., et Katoch VM. (2004). Optimisation of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3751-3753.

[33] P. R. J. Gangadharam, et P. A. Jenkins (1998a). Mycobacteria, basic aspects Eds. New York, in International Thomson Publishing. 1: 400.

[34] 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.

[35] Shinnick, T. M. et R. C. Good (1994). Mycobacterial taxonomy. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13 (11): 884- 901.

[36] Tsukamura, M 1984 Identification of mycobacteria. Mycobacteriosis research laboratory, National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan.

[37] Yates MD, Pozniack A, Uttley AHC, et al. isolation of environmental mycobacteria from clinical specimen in South East England, 1973-1993, Int J Tuberc Lung Dis 1997; 1: 75-80.

[38] Zamarioli LA, Coelho AG, Pereira CM, Nascimento AC, Ueki SY, Chimara E: Descriptive study of the frequency of non tuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of Sao Paulo, Brazil. J Bras Pneumol 2008, 34:590-594.42.

[39] Buijtels PC, van der Sande MA, de Graaff CS, Parkinson S, Verbrugh HA, Petit PL: Non tuberculous mycobacteria, Zambia. Emerg Infect Dis 2009, 15:242-249.

[40] Buijtels Patricia C. A. M., Pieter L. C. Petit, Henri A. Verbrugh, Alex van Belkum, and Dick van Soolingen. Isolation of Non tuberculous Mycobacteria in Zambia: Eight Case Reports; Journal of clinical microbiology, Dec. 2005, p. 6020–6026 Vol. 43, No. 12.

[41] Williamson HR, Benbow ME, Nguyen KD, Beach board DC, Kimbirauskas RK, et al. (2008) Distribution of Mycobacterium ulcerans in Buruli Ulcer Endemic and Non-Endemic Aquatic Sites in Ghana. PLoS Negl Trop Dis 2 (3): e205. doi:10.1371/journal. pntd.0000205.

Résumé

Justificatif : Le milieu naturel est considéré comme une source potentielle de Mycobactéries non-tuberculeuses (MNT). Elles sont souvent responsables d'infections pulmonaires et cutanées. En Côte d'Ivoire, le seul agent étiologique reconnu responsable des ulcérations est *Mycobacterium ulcerans,* responsable de l'Ulcère de Buruli. C'est un véritable problème de santé publique avec environ 2000 cas notifiés par an selon l`OMS. Il existe très peu d'informations sur la présence des Mycobactéries environnementales en Côte d`Ivoire.

Objectifs : Caractériser les Mycobactéries environnementales ulcératives probables dans des zones endémiques en Côte d`Ivoire. De façon spécifique, il s'agissait de :

- Identifier les Mycobactéries environnementales au niveau des zones cibles ;
- Déterminer les paramètres physico-chimiques de ces zones susceptibles d`influencer la présence des Mycobactéries ;
- Analyser les caractéristiques microbiologiques et moléculaires des souches de Mycobactéries isolées dans l'environnement.

Matériel : Les sites (Sokrogbo, Bodo (Tiassalé), Adiopodoumé, Adzopé, loka (Bouaké), Agboville et Aghien) ont été étudiés. Le matériel biologique était constitué d'échantillons d'eaux et de sédiments.

Méthodes : Les techniques de bactériologie classique et de biochimie ont été utilisées pour la culture et l'identification des espèces, les tests de biologie moléculaire pour le typage moléculaire, la photométrie pour le dosage des nutriments dans l'eau, la spectrophotométrie et la colorimétrie ont été utilisés pour le dosage des nutriments dans les sédiments.

Résultats : Un total de 473 échantillons a été obtenu dans cette étude. Au total, 7 espèces à croissance rapide ont été identifiées. Ce sont : *M. peregrinum, M. smegmatis, M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus, et Mycobacterium sp*. Sur le plan physico-chimique, l'analyse en composante principale (ACP) a permis d'évoquer des liens statistiquement significatifs entre la présence ou l'absence des Mycobactéries et quelques paramètres physico-chimiques (Conductivité, nitrite, chlore libre et le type d'échantillon). Sur le plan moléculaire, 20% des espèces de Mycobactéries à croissance rapide isolées était porteurs du gène IS2404 retrouvé chez *M. ulcerans*. 9,23% des souches abritent le gène de la Ketoreductase (Kr), l'une des enzymes de synthèse de la mycolactone. Au niveau des analyses génétiques utilisant les MIRU/VNTR, le MIRU 1 a été la séquence la plus amplifiée, et le LOCUS 6 le moins amplifié, aucun profil connu n`a été identifié dans cette étude.

Conclusion : Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de Mycobactéries à croissance rapide potentiellement pathogènes possédant des gènes de virulence attribuée auparavant à *M. ulcerans,* responsable de l'Ulcère de Buruli. Elle confirme également le rôle de l'eau et des sédiments en tant que facteur de risque de contamination pour la population vulnérable aux mycobactérioses. Cette étude serait la première étape pour comprendre l'origine des différentes infections cutanées rencontrées en Côte d`Ivoire.

Mots clefs : Mycobactéries, eaux, sédiments, mycobactérioses, Ulcère de Buruli, Chlorure de Cetylpiridium (CPC), Kétoreductase (Kr), IS2404, MIRU/VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units / Variable number tandem repeats).

Summary : The natural environment is considered a potential source of non-tuberculous Mycobacteria (NTM). They are often responsible for lung and skin infections. In Côte d'Ivoire, the only etiologic agent known to cause ulceration is *Mycobacterium ulcerans*, responsible for Buruli ulcer. This is a real public health problem with about 2000 cases reported annually by WHO. There is very little information on the presence of environmental Mycobacteria in Côte d'Ivoire.

Objectives: Characterize probable environmental ulcerative mycobacteria in endemic areas in Côte d'Ivoire. Specifically, it involved: - Identifying environmental Mycobacteria in target areas; - Determine the physicochemical parameters of these zones likely to influence the presence of Mycobacteria; - To analyze the microbiological and molecular characteristics of strains of Mycobacteria isolated in the environment. Material: The sites (Sokrogbo, Bodo (Tiassalé), Adiopodoumé, Adzopé, loka (Bouaké), Agboville and Aghien) were studied. The biological material consisted of water and sediment samples.

Methods: Classical bacteriology and biochemistry techniques were used for culture and species identification, molecular biology tests for molecular typing, photometry for nutrient determination in water, spectrophotometry and colorimetry. were used for the determination of nutrients in sediments.

Results: A total of 473 samples were obtained in this study. In total, 7 fast-growing species have been identified. These are: *M. peregrinum, M. smegmatis, M. immunogenicum, M. chelonae, M. mucogenicum, M. abscessus*, and *Mycobacterium sp.* On the physico-chemical level, the principal component analysis (PCA) made it possible to evoke statistically significant links between the presence or the absence of Mycobacteria and some physico-chemical parameters (Conductivity, nitrite, free chlorine and the type sample). Molecularly, 20% of fast-growing Mycobacteria species isolated harbored the IS2404 gene found in *M. ulcerans*. 9.23% of the strains harbor the Ketoreductase (Kr) gene, one of the synthetic enzymes of mycolactone. At the level of genetic analyzes using MIRU / VNTR, MIRU 1 was the most amplified sequence, and LOCUS 6 the least amplified, no known profile was identified in this study.

Conclusion: This study revealed the presence of potentially pathogenic fast-growing Mycobacteria with virulence genes previously assigned to *M. ulcerans*, responsible for Buruli ulcer. It also confirms the role of water and sediments as a risk factor for contamination for the population vulnerable to mycobacteriosis. This study would be the first step to understand the origin of the different skin infections encountered in Côte d'Ivoire.

Key words: Mycobacteria, water, sediment, mycobacteriosis, Buruli ulcer, Cetylpiridium chloride (CPC), Ketoreductase (Kr), IS2404, MIRU / VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units / Variable number tandem repeats).