



Agence française
de sécurité sanitaire
des aliments



Institut Lillois
d'Ingénierie
de la Santé

Mémoire de Master en Santé Publique
Spécialité Qualité et Sécurité Alimentaire

Etude de la diversité génétique des souches de *Mycobacterium avium* ssp. d'origine humaine et animale par typage moléculaire VNTR-MIRUs et RFLP1245-1311

Par

Nicolas Radomski

Stage réalisé du 03 mai 2007 au 31 octobre 2007

Sous la direction du

Dr María Laura Boschioli

LERPAZ : Laboratoire d'Etudes et de Recherches
en Pathologie Animale et Zoonoses
23 rue du Général de Gaulle
94706 Maisons-Alfort
Tél. : 01.49.77.13.21
Fax : 01.49.77.13.44
Site : <http://www.afssa.fr/>
Mél : ml.Boschioli@AFSSA.fr

ILIS : Institut Lillois d'Ingénierie
de la Santé
42, rue Ambroise Paré
59120 Loos
Tél. : 03.20.62.37.37
Fax : 03.20.62.37.38
Site : <http://ilis.univ-lille2.fr/>
Mél : suaio-sante@univ-lille2.fr





Agence française
de sécurité sanitaire
des aliments



Institut Lillois
d'Ingénierie
de la Santé

Mémoire de Master en Santé Publique
Spécialité Qualité et Sécurité Alimentaire

Etude de la diversité génétique des souches de *Mycobacterium avium* ssp. d'origine humaine et animale par typage moléculaire VNTR-MIRUs et RFLP1245-1311

Par

Nicolas Radomski

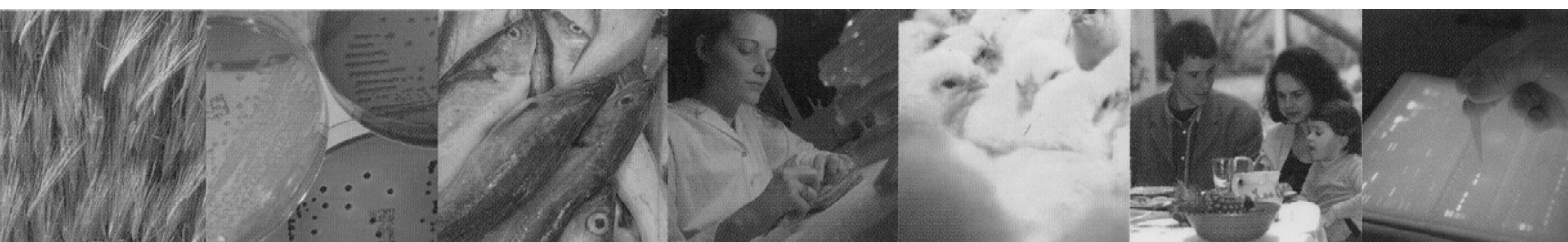
Stage réalisé du 03 mai 2007 au 31 octobre 2007

Sous la direction du maître de stage

Dr María Laura Boschioli

LERPAZ : Laboratoire d'Etudes et de Recherches
en Pathologie Animale et Zoonoses
23 rue du Général de Gaulle
94706 Maisons-Alfort
Tél. : 01.49.77.13.21
Fax : 01.49.77.13.44
Site : <http://www.afssa.fr/>
Mél : ml.Boschioli@AFSSA.fr

ILIS : Institut Lillois d'Ingénierie
de la Santé
42, rue Ambroise Paré
59120 Loos
Tél. : 03.20.62.37.37
Fax : 03.20.62.37.38
Site : <http://ilis.univ-lille2.fr/>
Mél : suaio-sante@univ-lille2.fr



Remerciements

Je remercie Monsieur Boireau et Monsieur Garin-Bastuji, respectivement Directeur par intérim du Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses, et Chef de l'Unité de Zoonoses Bactériennes, de m'avoir accueilli dans cette unité de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments de Maisons-Alfort, qui travaille sur des problématiques intégrées dans des programmes conjoints Organisation Internationale de l'Alimentation et de l'Agriculture/Organisation Mondiale de la Santé Animale.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon maître de stage, Madame Boschioli Responsable du Laboratoire National de Référence des mycobactéries à l'Unité de Zoonoses Bactériennes, pour son aiguillage sur les avancées du projet d'étude, qui rentre dans le cadre de la validation du Master d'Ingénierie et de Management de la Santé mention Qualité et Sécurité Alimentaire, que je termine à l'Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé.

Merci aussi à l'ensemble des membres et stagiaires de l'Unité de Zoonose Bactériennes, pour leur accueil chaleureux et les explications qu'ils m'ont apportées, en ce qui concerne le fonctionnement du laboratoire de Sécurité Biologique de niveau 3, les modalités d'utilisation des salles de biologie moléculaire, ainsi que l'organisation générale des équipes.

D'autre part, je remercie Monsieur Biet, Directeur de l'Unité Infection Animale des mycobactéries à l'Institut National de Recherche Agronomique de Tours, de m'avoir accueilli dans ce laboratoire, pour participer à un programme européen d'entraînement inter-laboratoires au près de Madame Thibault, qui m'a beaucoup aidé dans l'application d'une méthode de typage moléculaire novatrice qui a été utilisée dans cette étude.

Un grand merci doit aussi être fait à Madame Gutiérrez, du laboratoire de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes de l'Institut Pasteur de Paris, pour nous avoir fourni des souches isolées de patients immunocompétents et immunodéprimés.

Je tiens aussi à faire mes remerciements à Madame Brisabois et Madame Kerouanton, respectivement Directrice du Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés et Responsable de l'Equipe Typage Moléculaire à l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments de Maisons-Alfort, pour m'avoir permis d'utiliser un logiciel de traitement taxonomique des profils génétiques issus des typages des souches d'étude.

Introduction

L'épidémiologie des infections liées au complexe de *Mycobacterium avium*, ainsi que les bases moléculaires de la transmission inter-espèces, sont relativement mal connues. Toujours est-il que ce complexe hétérogène de bacilles ubiquitaires, saprophytes et à croissance lente, comprend des sous-espèces pathogènes opportunistes pour l'homme et les animaux comme notamment les ruminants, les oiseaux ou les porcs. Plus précisément, la sous-espèce *Mycobacterium avium* ssp. *avium* qui a déjà été décrite dans l'infection d'élevages de volailles et d'élevages familiaux d'oiseaux est, au même titre que *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis*, capable d'infecter l'homme essentiellement chez des individus immunodéprimés. Les sous-espèces *Mycobacterium avium* ssp. *avium* et *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis*, entraînent en particulier une infection chez le porc. Indépendamment de la sous-espèce responsable de l'infection, le porc, qui est porteur sain, présente des adénites dans les ganglions céphaliques et à l'encolure aboutissant, pour cause d'une suspicion de tuberculose, à une saisie partielle des carcasses à l'abattoir. Une saisie totale des carcasses a même lieu lorsque des lésions du foie, des intestins et/ou des ganglions mésentériques sont observées, comme récemment dans des élevages de porcs du Calvados, qui n'ont pas été indemnisés du fait que la tuberculose aviaire n'est pas réglementée. D'autre part, *Mycobacterium avium* ssp. *avium* et *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis* peuvent provoquer uniquement des adénites chez les bovins, ce qui peut faire suspecter une tuberculose bovine pendant l'inspection de routine à l'abattoir, du fait que les lésions sont semblables. De plus, au cours des inspections vétérinaires des troupeaux par l'intra-dermo-tuberculation recherchée dans la prophylaxie de la tuberculose bovine, des réactions croisées sont observables chez des animaux infectés par *Mycobacterium avium*. Cela implique l'arrêt des activités d'élevage jusqu'à la levée de la suspicion, qui a lieu 2 mois plus tard pour réaliser à nouveau une intra-dermo-tuberculation, ou 3 mois plus tard pour obtenir des résultats de bactériologie.

En vue de la méconnaissance des liens épidémiques existant entre les pathologies humaines et animales, et des problèmes économiques soulevés par les infections à *Mycobacterium avium*, l'étude suivante vise à étudier la diversité génétique des *Mycobacterium avium*, via l'utilisation d'une méthode de typage moléculaire classique et d'une méthode de typage moléculaire novatrice. Plus précisément, les objectifs sont multiples et pour se faire les résultats suivants étaient attendus :

- évaluer le degré de polymorphisme des souches étudiées.
- améliorer les connaissances de la taxonomie.
- mieux définir les possibilités de transmissions inter-espèces.
- déterminer si des profils génétiques sont spécifiques de l'hôte.
- comparer les deux méthodes de typage moléculaire dans un objectif de diagnostique.

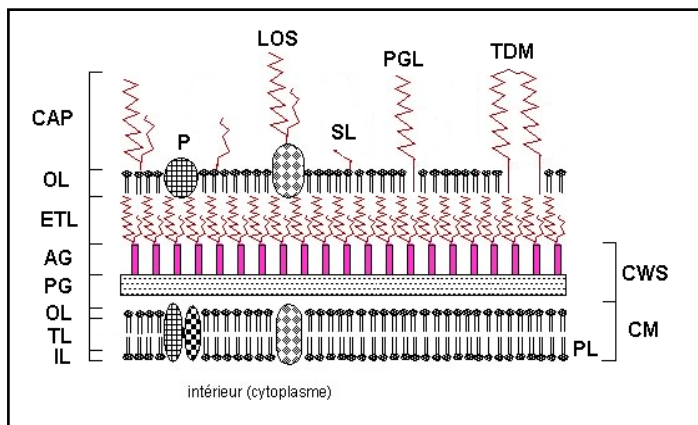
Après une recherche bibliographique sur les germes étudiés, ainsi que sur les méthodes de typage mises en application, une présentation détaillée de l'étude sera effectuée, et les résultats seront présentés afin de les discuter et conclure quant-aux différentes interrogations soulevées.

I / Etude bibliographique

I.1 / *Mycobacterium avium*

I.1.a / Morphologie

Les *Mycobacterium* se caractérisent par la nature de leur paroi (Figure 1), permettant de réaliser la coloration de Ziehl-Neelsen, qui consiste à fixer à chaud les bacilles, les colorer par la fuchine (5min), et les décolorer par l'acide nitrique au ¼ (1min) puis par l'alcool 96° (2min30s). Une contre-coloration par le bleu de méthylène phéniqué (1min) est réalisée pour colorer les autres bactéries. Dans ces conditions les mycobactéries ne se décolorent pas, apparaissent roses et sont dites acido-alcool-résistantes. Effectivement, la fuchine a la propriété de se fixer à l'acide mycolique, et les cires de mycolate d'arabinogalactane s'opposent à la pénétration des colorants et décolorants car elles sont très hydrophobes.



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

(Legrand *et al.* 2000)

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

Les *Mycobacterium* sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, Gram +, catalase +, aérobies, acido-alcool-résistantes, d'environ 1 à 10µm de long sur 0,2 à 0,6µm de large. Leur croissance est très lente pour les pathogènes et les opportunistes, ou rapide pour les autres. *M. avium* est très diversifié du point de vue antigénique, car avec l'espèce *Mycobacterium intracellulare*, ils représentent au moins 28 sérotypes selon la procédure historique de Schaefer (Anonymous 2004; Inderlied *et al.* 1993), dont les sérotypes 1 à 6, 8 à 11 et 21 ont été associés à l'espèce *M. avium* (Wayne *et al.* 1993). Comme il sera vu par la suite, cette étroite relation antigénique, est actuellement palliée par les outils moléculaires qui distinguent les espèces *M. avium* et *M. intracellulare*. D'autre part, des caractéristiques biochimiques et de croissance ont été associées à certains sérotypes de *M. avium*. Effectivement, les sérotypes 2 et 16 n'auraient pas la capacité d'utiliser le n- et iso-butanols comme unique source de carbone en présence de nitrogène ammoniacal. Le sérotype 2 se développerait à +45°C et n'aurait pas d'activité arylsulfatase, alors que le sérotype 16 ne se développerait pas à +45°C et aurait une activité arylsulfatase. Les sérotypes 8, 9 et 15 se développeraient à +45°C, pourraient utiliser le n- et iso-butanols, et posséderaient l'activité arylsulfatase (Tsukamura *et al.* 1982).

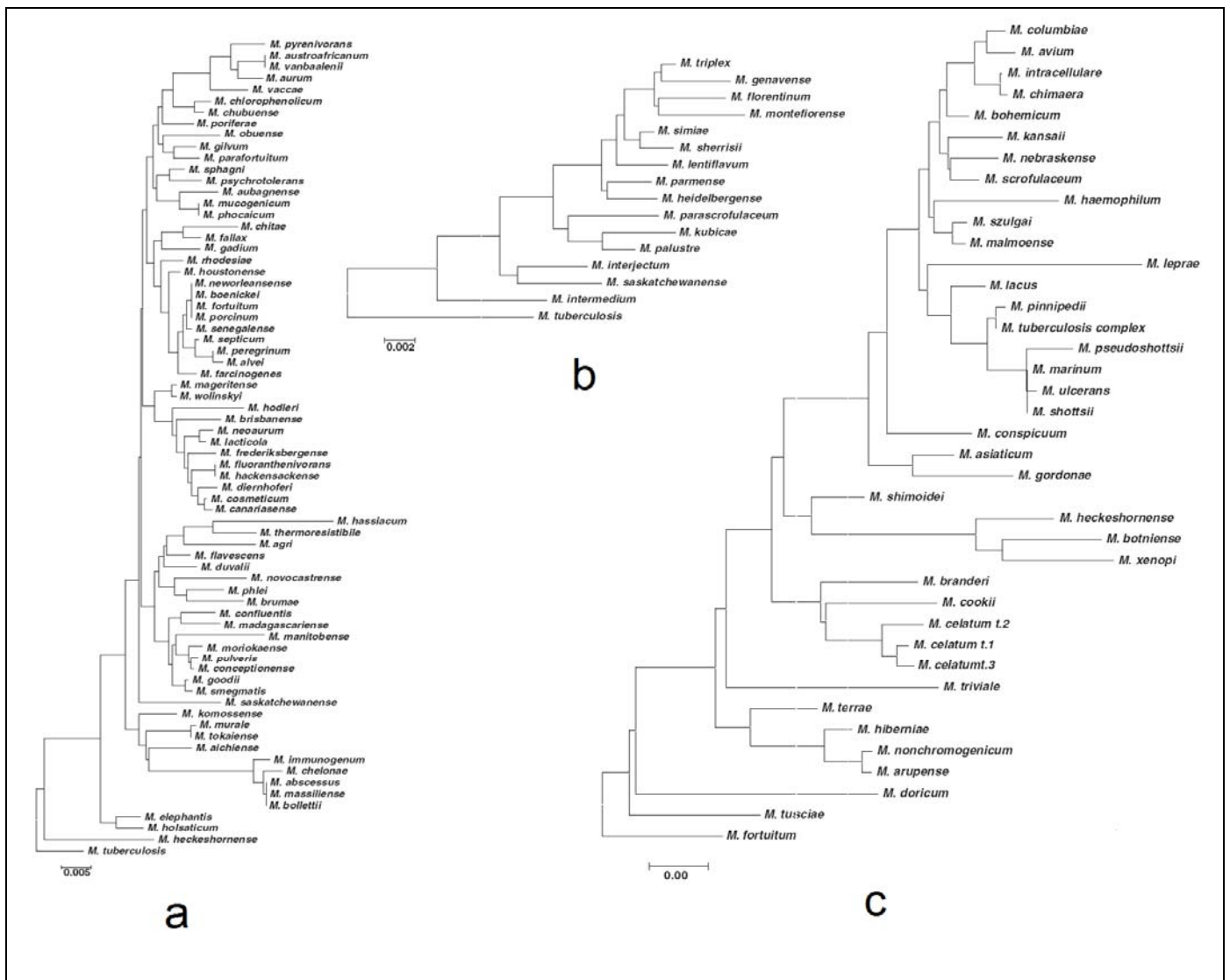
I.1.b / Taxonomie

- Les genres de la famille *Mycobacteriaceae*

La famille des *Mycobacteriaceae* regroupe l'unique genre *Mycobacterium*. Ce genre *Mycobacterium* est inclus dans un ensemble regroupant les genres *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*, qui se distinguent notamment par la proportion de leur génome en guanine-cytosine, qui sont respectivement de 48 à 59% ; 62 à 70% ; 64 à 69% et 63 à 73% (Cocito *et al.* 1994).

- Les espèces du genre *Mycobacterium*

Le genre *Mycobacterium* contient environ 120 espèces, dont très peu n'ont pas été décrites dans des infections chez l'homme. Ce nombre a doublé en 15ans avec 30 espèces découvertes depuis 3ans. De récents travaux ont révélé que l'identification des genres de *Mycobacterium* pouvait passer par l'identification des séquences de l'ADN ribosomique 16S (Figure 2).



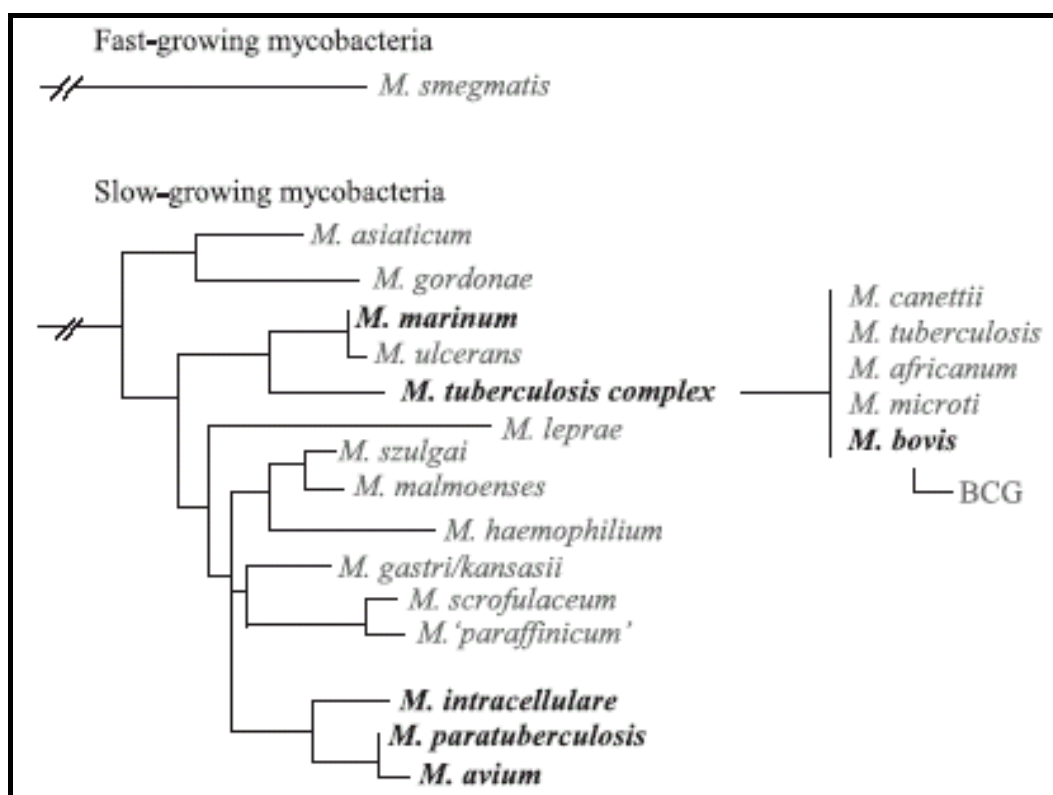
(Tortoli 2006)

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

Par opposition aux membres du complexe MTC (*Mycobacterium tuberculosis* complexe) intégrant *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. africanum* et *M. microti*, les autres espèces du genre *Mycobacterium* comme par exemple, *kansasii*, *szulgai*, *gordonae*, *asiaticum*, *simiae*, *marinum*, *malmoense*, *intracellulare*, *avium* (Kasai *et al.* 2000), *xenopi*, *terrae*, *triviale*, *chelonei*, *fortuitum* (Rastogi *et al.* 1993), *gastri*, *scrofulaceum*, *phlei* (Bartos *et al.* 2006) ou *leprae* (Cocito *et al.* 1994), sont dites non tuberculeuses (Legrand *et al.* 2000). Cette multiplicité non exhaustive des espèces de *Mycobacterium* a donné lieu à des regroupements sous forme de complexes (Bartos *et al.* 2006) : MAC (*Mycobacterium avium* complexe), MIC (*Mycobacterium intracellulare* complexe) et MTC pour les plus courants.

- L'espèce *avium* du genre *Mycobacterium*

L'espèce *Mycobacterium avium* étudiée fait partie des Mycobactéries opportunistes à croissance lente. Certaines *M. avium* nécessitent de la mycobactine, un chélateur de métaux nécessaire au transport transmembranaire (Cocito *et al.* 1994). Alors que les techniques de sérotypage rendaient difficiles la différenciation des espèces *M. avium* et *M. intracellulare*, le séquençage de l'ADNr 16S, rend aujourd'hui celle-ci plus aisée (Figure 2 et Figure 3). De plus, du fait des caractéristiques culturelles et biochimiques identiques pour ces deux espèces (Annexe 1 et Annexe 2), aujourd'hui la recherche de l'élément d'insertion IS1245 est communément réalisée pour différencier *M. avium* de *M. intracellulare*, car seul *M. avium* procède cet élément d'insertion (Guerrero *et al.* 1995).



(Biet *et al.* 2005a)

Figure 3 : Arbre phylogénique de mycobactéries à croissance lente, basé sur le séquençage de l'ADNr 16S

- Les sous-espèces de *Mycobacterium avium*

Plus précisément, dans la littérature l'espèce *M. avium* comporte quatre sous-espèces, dont ssp. *avium*, ssp. *hominissuis*, ssp. *paratuberculosis* et ssp. *silvaticum* (Biet *et al.* 2005a), qui ont des caractéristiques culturelles et biochimiques différentes (Annexe 3). Initialement, les sous-espèces *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*, ont été nommées en fonction de leur pathogénicité et des caractéristiques de leurs hôtes, et ont été regroupées au sein de l'espèce *avium* suite à la démonstration qu'elles étaient issues de la même lignée génétique (Thorel *et al.* 1990). Par la suite, une étude sur les caractéristiques moléculaires de *M. avium* ssp. a permis de confirmer que les souches d'origine aviaire, autre que *M. avium* ssp. *silvaticum* encore nommée wood-pigeon, présentaient un profil phylogénétique unique et distinct des *M. avium* isolés de l'homme ou du porc. Cela a conduit à la proposition de nommer *M. avium* ssp. *avium* les souches présentant un profil génétique aviaire autre que celui de *M. avium* ssp. *silvaticum*, et *M. avium* ssp. *hominissuis* les souches présentant un profil génétique semblable isolées de l'homme et des mammifères, en particulier le porc (Mijs *et al.* 2002). Il est à noter que les sérotypes 1, 2 et 3 sont généralement associés à *M. avium* ssp. *avium*, et que les sérotypes 4 à 6 ainsi que 8 à 11 et 21 sont associés à *M. avium* ssp. *hominissuis* (Dvorska *et al.* 2004), alors que les espèces *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* ssp. *silvaticum* ne sont pas actuellement sérotypables. Sur le plan moléculaire la sous-espèce *M. avium* ssp. *paratuberculosis* est la seule dans le MAC à contenir l'élément d'insertion IS900 (Green *et al.* 1989). Quant-aux sous-espèces *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *silvaticum*, il est apparu par la découverte d'un élément d'insertion IS901 (Kunze *et al.* 1991), que celles-ci le possédaient, alors que la sous-espèce *M. avium* ssp. *hominissuis* en était dépourvue (Dvorska *et al.* 2004; Kunze *et al.* 1992; Pavlik *et al.* 2000). Par ailleurs, contrairement à *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*, la sous-espèce *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ne présente pas l'élément d'insertion IS1245 (Johansen *et al.* 2005; Legrand *et al.* 2000).

I.1.c / Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence de *M. avium* sont très mal connus, néanmoins certains de ces facteurs sont des éléments membranaires communs aux mycobactéries reconnues historiquement pathogènes chez l'homme, comme *M. tuberculosis* ou *M. leprae*, responsables respectivement de la tuberculose et de la lèpre.

- Glycopeptidolipide

Un groupe immunologique de glycolipides comprend un ensemble de glycopeptidolipides, incluant une mycoside C polaire, qui a par ailleurs été démontrée comme fortement immunoréactive (Cocito *et al.* 1994). Ces glycopeptidolipides formeraient une barrière nommée ETZ (Electron-Translucent Zone), prévenant la destruction intracellulaire du bacille par l'hôte, et serait responsable du changement du morphotype de la bactérie de SmT (Smooth, flat and Transparent) à SmD (Smooth, Domed and opaque), qui s'accompagnerait de la perte de la faculté intra-cellulaire à se multiplier (Shiratsuchi *et al.* 1994). Le morphotype SmT, ayant

la faculté à se multiplier dans les cellules de l'hôte, serait associé à une protéine SmT 66 de 66kDa, qui jouerait un rôle dans l'apparition de ce morphotype plus pathogène (Prinzis *et al.* 1994).

- Glycolipide membranaire

Un deuxième groupe immunologique de glycolipides est un ensemble de glycolipides membranaires inclus dans la paroi de la mycobactérie, qui est nommée LAM (Lipoarabinomannan). C'est ce complexe antigénique qui est le plus réactif dans les cas de lèpre ou tuberculose humaine, et dans les cas de paratuberculose chez l'animal, car il stimule les lymphocytes B, induit la suppression des cellules T, et module la production de lymphokine (Cocito *et al.* 1994).

- Glycolipides phénoliques

Le troisième groupe immunologique de glycolipides est un ensemble de glycolipides phénoliques, dont les plus connus sont des composants de *M. leprae*. Néanmoins, la recherche sérologique de ces groupes d'antigènes de virulence, amène à des résultats croisés notamment avec les espèces *M. bovis* (Cocito *et al.* 1994). Ces glycolipides phénoliques, comme le LAM, sont des constituants de la paroi de certaines mycobactéries qui protègent celle-ci des attaques oxydatives des macrophages.

I.1.d / Antibiorésistance

L'étude de l'architecture de la paroi des mycobactéries atypiques a permis de suggérer que celles-ci jouent un rôle majeur dans leur virulence et dans la résistance naturelle de ces bactéries aux antituberculeux classiques (Legrand *et al.* 2000). Plus précisément, il semblerait que le morphotype des *M. avium* isolées en milieu clinique sur un milieu gélosé et supplémenté au rouge de Congo, sont variables en fonction de la virulence. En effet, il a été observé que le passage des variants de couleur blanche à rouge pendant les phases de croissance, s'accompagnait d'une diminution de la résistance aux antibiotiques comme la clarithromycine et la rifampicine. Bien que les variants rouges soient plus stables, il a par ailleurs été observé des facultés de résistance intra-cellulaire plus importantes pour les variants blancs (Cangelosi *et al.* 2001). Néanmoins, d'autres antibiotiques comme l'amikacine, la ciprofloxacine, la clofazimine, l'éthambutole, la rifabutine, la cyclosérine ou l'éthionamide, peuvent être utilisés dans le traitement des infections à MAC (Inderlied *et al.* 1993).

I.1.e / Mécanisme de virulence

Les mécanismes de virulence de *M. avium* sont très mal connus. Néanmoins, les macrophages humains ont la faculté de phagocyter *M. avium* ssp. autre que *paratuberculosis*, via le composant C3 du complément, qui fixerait une protéine HbhA (Heparin-Binding Hemagglutinin) de la membrane du bacille et qui activerait la phagocytose (Mueller-Ortiz *et al.* 2001). Le récepteur à fibronectine serait aussi responsable de l'intégration des bacilles aux macrophages en relation avec l'activité d'un anion super-oxyde sécrété par la cellule phagocytaire (Inderlied *et al.* 1993). D'autre part, une expérimentation par inoculation artificielle de macrophage de moelle osseuse de souris (Annexe 4), a démontré que le MAC a la capacité à résister aux

attaques de macrophages et de se multiplier dans ses phagosomes du fait d'une altération physiologique de ces derniers (Schaible *et al.* 1998). De plus, d'autres observations indiquent que des souches viables de MAC ont la capacité d'inhiber partiellement les fusions entre les phagosomes et les lysosomes, ce qui freine la lyse des mycobactéries par les enzymes de protéolyse des lysosomes (Frehel *et al.* 1986; Inderlied *et al.* 1993). Au plan génétique, il semble que la virulence du MAC soit multifactorielle, en incluant le morphotype (rough ou smooth), la présence d'un plasmide, et la présence de l'élément d'insertion IS901 (Kunze *et al.* 1991).

I.1.f/ Pouvoir pathogène chez l'homme

- *Mycobacterium avium*

D'une part, *M. avium* ssp. autre que *paratuberculosis* et *silvaticum*, est un pathogène opportuniste, intra-cellulaire car il se multiplie dans les macrophages, et extra-cellulaire du fait qu'il peut se retrouver dans des compartiments comme la laminine, la fibronectine, et certaines formes de collagène (Denis 1994). Historiquement, la tuberculose provoquée par *M. tuberculosis* et la lèpre provoquée par *M. leprae*, sont les deux mycobactéries prépondérantes dans l'infection de l'homme, mais depuis l'avènement du SIDA (Syndrome d'Immuno Déficience Acquise) accompagné par la diminution quantitative des cas de tuberculose et de lèpre dans les pays développés, les mycobactéries non tuberculeuses, en particulier celles du MAC, ont une incidence qui augmente (Portaels 1995). En effet, le MAC est fréquemment isolé des systèmes respiratoires et gastro-intestinaux de patients infectés par le HIV (Human Immune Virus) qui présentent au bout d'un an, un risque de développement de bactériémies d'environ 45% chez des patients à moins de 50 lymphocytes CD4⁺/µl (Chin *et al.* 1994). Effectivement, les *M. avium* ont des facteurs de virulence pouvant expliquer cette faculté à infecter les personnes immunodéprimés comme les patients atteints du SIDA, dont la perte des lymphocytes T facilite l'invasion de *M. avium*. Il a été démontré que l'exposition au MAC est semblable entre les pays développés et les pays en voie de développement, mais que le degré d'immunisation dans les pays développés est plus important que dans les pays en voie de développement, ce qui contribue à une dissémination du MAC plus aisée chez les personnes atteintes du SIDA dans les régions en voie de développement (Fordham von Reyn *et al.* 1993). Néanmoins, dans les pays développés, 10 à plus de 50% des patients atteints du SIDA contractent une infection à mycobactéries non tuberculeuses, avec à plus de 90% des infections provoquées par le MAC (Portaels 1995). En France, les souches associées aux infections du MAC chez les patients atteints du SIDA se sont avérées être des sérotypes 1, 4 et 8 (Picardeau *et al.* 1997), en Suède des sérotypes 6, 1 et 4 (Hoffner *et al.* 1990), et aux USA des sérotypes 1, 4 et 8, qui représentent 2/3 de la totalité des infections à *M. avium* (Legrand *et al.* 2000), avec majoritairement le sérotype 8 à Los Angeles et le sérotype 4 à San Francisco ou New-York (Yakrus and Good 1990). Ces données indiqueraient, qu'en fonction de la région d'isolement, les sérotypes 1, 4, 6 et 8 sont généralement associés aux infections du MAC chez les patients atteints du SIDA.

M. avium ssp. autre que *paratuberculosis* et *silvaticum*, peut aussi être la cause d'infections pulmonaires, et en particulier chez des personnes atteintes d'obstructions chroniques des poumons, de bronchiectasies, de pneumonies chroniques, de pneumoconioses, ou de carcinomes bronchiques. Les symptômes en question sont variés et non spécifiques, en incluant de la toux grasse chronique, de la dyspnée, de la sueur, des malaises, de la fatigue, de l'hémoptysie, de la fièvre ou encore des pertes de poids (Inderlied *et al.* 1993). En France, l'incidence de maladies pulmonaires causées par les MAC a été estimée à 0,2 pour 100000 habitants HIV négatif entre 2000 et 2002 (Maugein *et al.* 2005). Par ailleurs, une étude au Japon ne révèle pas de lien épidémique entre des souches du MAC isolées de cas d'infections pulmonaires dans deux familles. Effectivement, celle-ci arrive à la conclusion que les défaillances du système immunitaire chez ces deux familles, ont permis des infections distinctes par des souches du MAC de profils génétiques distincts (Tanaka *et al.* 2000).

En parallèle de ces infections des patients atteints du SIDA et des personnes présentant des déficiences respiratoires, des infections particulièrement rares de l'homme par certains membres du MAC, sont à noter. Par exemple, en ce qui concerne la rifabutine généralement utilisée dans la prophylaxie et le traitement du MAC chez les patients atteints du SIDA, deux cas uniques à Taiwan d'uvéïte hypopyon induits par la rifabutine (Wang *et al.* 2007), ont été décrits récemment chez des patients atteints du SIDA présentant une infection à MAC (Annexe 5). D'autre part, une souche du MAC a été isolée chez des patients atteints de sarcoïdose à partir de prélèvements issus de la peau et du fluide cérébro-spinal (el-Zaatari *et al.* 1996). L'identification de la souche en question s'est avérée être *M. avium paratuberculosis* ou une souche du MAC apparentée à cette dernière. La sarcoïdose est une maladie systémique qui atteint généralement les poumons (Annexe 6), et pour laquelle des manifestations cutanées de sarcoïdose sont possibles (Annexe 7).

- *Mycobacterium avium* ssp. *avium* et ssp. *hominissuis*

Avant la récente proposition de différencier les sous-espèces *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis* (Mijs *et al.* 2002), des cas cliniques humains ont été attribués à *M. avium* ssp. *avium*. Les principaux effets chez l'homme de *M. avium* ssp. *avium* ont été identifiés comme étant des infections pulmonaires chez l'adulte, des adénopathies chez l'enfant et des infections chez les patients atteints du SIDA (Thorel *et al.* 1990). Au Danemark, une étude comparative sur des patients atteints ou non du SIDA présentant une infection à MAC entre 1994 et 1996, a identifié la sous-espèce *M. avium* ssp. *avium* pour 85 des 90 patients HIV positifs, et pour 73 des 130 patients HIV négatifs (Bauer *et al.* 1999). Néanmoins dans ces études antérieures à la découverte de la sous-espèce *hominissuis*, les identifications de *M. avium* ssp. *avium* n'intégraient pas le fait que contrairement à la sous-espèce *hominissuis*, la sous-espèce *avium* posséderait la séquence d'insertion IS901.

Ainsi aujourd'hui, l'espèce *M. avium* ssp. *hominissuis* semble être la sous-espèce du MAC responsable d'infections chez les patients HIV positifs. En effet, une étude menée sur 81 souches de *M. avium* issues de patients américains, australiens et européens atteints du SIDA, n'a identifié aucune souche de

M. avium ssp. *avium*, nommée à cette époque *M. avium* de type A/I, mais a identifié des souches nommées *M. avium* de type A, qui présentent des caractéristiques biochimiques et moléculaires attribuées aujourd'hui à *M. avium* ssp. *hominissuis* (Kunze *et al.* 1992). Plus récemment, des études a posteriori de la proposition de différenciation des sous-espèces *avium* et *hominissuis* (Mijs *et al.* 2002), ont permis d'attribuer la sous-espèce *hominissuis* à des souches d'origine humaine. Par exemple, une étude en Allemagne sur les lésions tuberculeuses causées par *M. avium*, a identifié *M. avium* ssp. *hominissuis* pour l'ensemble des 45 souches d'origine humaine testées (Möbius *et al.* 2006).

Historiquement, les sérotypes associés généralement aux infections chez les patients HIV positifs étant 1, 4, 6 et 8 ; l'espèce *M. avium* ssp. *avium* (sérotypes 1) et l'espèce *M. avium* ssp. *hominissuis* (sérotypes 4, 6 et 8) seraient donc capables d'infecter des patients HIV positifs. Cette ambiguïté amène l'hypothèse selon laquelle *M. avium* ssp. *hominissuis* a remplacé *M. avium* ssp. *avium* dans les infections des patients atteints du SIDA. Ou à contrario, ces infections ne sont liées qu'à *M. avium* ssp. *hominissuis*, et par conséquent l'identification du sérotype 1 est erronée quant à l'attribution de la sous-espèce *avium*. Il se peut aussi que le sérotype 1 de *M. avium* ssp. *avium* soit plus virulent que les autres sérotypes de *M. avium* ssp. *avium*, ou que dans le passé ce sérotype 1 ait été prédominant dans les infections des patients atteints du SIDA.

D'autre part, des différences de la virulence chez l'homme apparaissent entre *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis*. Effectivement, une étude a comparé une souche de *M. avium* ssp. *avium* du sérotype 2 et une souche de *M. avium* ssp. *hominissuis* du sérotype 8, isolées respectivement d'un poulet et d'un cas clinique de patient atteint du SIDA. Cette étude a suivi pour ces deux souches, leur capacité à se lier à des cellules intestinales humaine, à se développer dans des macrophages humains, et à stimuler la réplication du HIV. La souche de *M. avium* ssp. *hominissuis* isolée du patient, présentait une affinité avec une lignée de cellule intestinale humaine 1,7 fois plus élevée que la souche *M. avium* ssp. *avium*, ainsi qu'une capacité 12 fois plus importante à se multiplier dans une lignée humaine de macrophage sanguin, accompagnée d'une faculté à détruire ces mononucléaires. De plus, lors de co-infections de cellules humaines, la souche de *M. avium* ssp. *hominissuis* isolée du patient s'est avérée stimuler 3 fois plus la réplication du HIV, que la souche de *M. avium* ssp. *avium* isolée du poulet (Birkness *et al.* 1999). Cela indiquerait que *M. avium* ssp. *hominissuis* est plus virulent chez l'homme, que ne l'est *M. avium* ssp. *avium*.

- *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Suite à la mise en évidence de *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, il a été établi que la maladie humaine de Crohn pourrait avoir une étiologie bactérienne (Legrand *et al.* 2000). Cette maladie est en général une inflammation du gros intestin sous forme de granulomes, et l'agent responsable de l'infection présente des caractéristiques culturales et biochimiques semblables à celles de *M. avium* ssp. *paratuberculosis*. A ce jour, l'état des recherches rend difficile d'affirmer que l'agent responsable de la maladie Crohn est *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, ou encore une nouvelle espèce de mycobactérie (Thorel 1989).

- *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum*

M. avium ssp. *silvaticum* n'a pas encore été associé à une maladie humaine (Legrand *et al.* 2000).

I.1.g / Pouvoir pathogène chez les animaux

- *Mycobacterium avium*

Les *M. avium* ont la capacité d'infecter une grande diversité d'animaux (Annexe 8), tel que les oiseaux, les porcs, les bovins, les daims, les moutons, les chèvres, les chevaux, les chats et les chiens, qu'ils soient domestiques ou non (Thorel *et al.* 1997). Néanmoins, pour des raisons économiques évidentes, la majorité des études menées à ce jour ont porté sur des animaux d'élevage. Effectivement, la tuberculose des porcs est causée par *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. intracellulare*, mais aussi par *M. avium*. Le porc, qui est porteur sain (Viallier *et al.* 1976), peut être contaminé par *M. avium* du sérotype 1, 2, 4 ou 8. Il peut être détecté comme contaminé au niveau de l'abattage, par observation de lésions du foie, de la rate, des poumons, des reins et des ganglions lymphatiques, ou par observation de granulomes sur la muqueuse intestinale, le tractus digestif, les ganglions lymphatiques, mésentériques, cervicaux et mandibulaires (Straw *et al.* 1999). La transmission entre les porcs gardés dans un même enclos, a été démontrée au cours d'une étude par inoculation artificielle de *M. avium* du sérotype 8 (Thoen *et al.* 1976). Un cas d'avortement chez une truie, a aussi été décrit comme ayant été causé par une souche de *M. avium* du sérotype 1. Des lésions du foie, des reins, et de l'utérus, ont été observées, ainsi que des granulomes dans les amygdales, le foie, les reins et les ganglions lymphatiques (Ellsworth *et al.* 1979). Une étude sur l'augmentation des cas de tuberculoses chez le porc en Arizona entre 1975 et 1978, a conclu que la sciure et les copeaux, utilisés pour coucher les animaux, pouvaient être l'un des vecteurs de la transmission de *M. avium* du sérotypes 1, 2, 4, 5 et 8, généralement rencontrés chez les porcs aux USA (Songer *et al.* 1980). Ce vecteur de contamination par des *M. avium* de sérotype 8, a aussi été décrit dans une étude d'élevages de porcs en République Croate, qui par ailleurs a conclu que les *M. avium* du sérotype 2 pouvaient aussi infecter le porc avec comme vecteur de contamination la fiente de moineaux (Cvetnic *et al.* 1996). L'ensemble de ces données indiqueraient donc que *M. avium* ssp. *avium* (sérotypes 1 et 2) et *M. avium* ssp. *hominissuis* (sérotypes 4, 5 et 8) peuvent infecter le porc. Outre les élevages de porc, différents clones des *M. avium* ont été rencontrés dans une épidémie d'oies naines (*Anser erythropus*) d'une ferme d'élevage, dont l'origine n'a pas pu être clairement établie (Kauppinen *et al.* 2001).

- *Mycobacterium avium* ssp. *avium* et ssp. *hominissuis*

M. avium ssp. *avium* est fréquemment isolé de l'environnement, et est l'agent infectieux de la tuberculose des oiseaux et des volailles. La mort de l'animal survient suite à une anémie, à une hypertrophie du foie et à l'apparition de masses noduleuses le long de l'intestin (Thorel *et al.* 1997). Néanmoins, cette sous-espèce peut être la cause d'infections chez d'autres animaux comme les bovins, les moutons, les chèvres, les porcs, les chats ou encore les kangourous (Thorel *et al.* 1990). Récemment en 1999, une augmentation des lésions tuberculeuses des ganglions lymphatiques, a été observée dans des abattoirs de

porcs en République Tchèque. Il a été démontré à ce sujet que la tourbe, utilisée comme complément alimentaire pour le porc, est un vecteur significatif de contamination par *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis* (Matlova *et al.* 2005), et que la contamination du porc par *M. avium* ssp. *hominissuis* pouvait être causée par les sciures et les copeaux de bois utilisés pour coucher ces animaux (Matlova *et al.* 2004). Les bovins peuvent aussi être contaminés par ces deux espèces du MAC. En effet, toujours en République Tchèque, *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis* ont été isolés de carcasses de bétail entre 1996 et 2000. Les résultats de cette étude indiquent, que depuis l'éradication de la tuberculose bovine dont l'agent étiologique est *M. bovis*, les agents responsables des lésions tuberculeuses du bétail font parti du MAC, et sont principalement représentés par *M. avium* ssp. *avium* (Dvorska *et al.* 2004). Néanmoins, l'augmentation du taux d'infection par *M. avium* constaté chez les bovins, pourrait s'expliquer par le fait que celle-ci provoque de fausses réactions positives en ce qui concerne la recherche *M. bovis* (Thorel 1978). Effectivement, la prophylaxie mise en œuvre dans la surveillance de la tuberculose bovine provoquée par *M. bovis*, amène à isoler de plus en plus de *M. avium*, car ces deux germes répondent tous les deux à l'intra-dermo-tuberculation.

- *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

La maladie de Johne, ou paratuberculose, affecte les animaux sauvages et domestiques sur les quatre continents. L'agent étiologique de cette maladie, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, peut affecter les bovins, les moutons, les chèvres, ainsi que les cerfs, les antilopes, les bisons, les dromadaires, les lamas, les chevaux, les souris, les rats, les lapins, les hamsters, le cochon et d'autres animaux. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* envahit le tractus intestinal des animaux se nourrissant d'aliments contaminés, et se sont les jeunes animaux qui sont les plus sujets à l'infection car leurs systèmes immuns ne sont pas totalement formés. Malgré que la transmission intra-utérine ne soit que relativement rare, il semble que l'infection d'un nouveau-né puisse se faire via le colostrum ou le lait de la mère. Ces mycobactéries sont en suite phagocytées par les cellules épithéliales, ainsi que par leurs macrophages. Il en résulte l'apparition de granulomes au site d'entrée. Les symptômes caractéristiques chez le bétail sont des inflammations catarrhales chroniques avec hyperplasie et des inflammations des histiocytes de la *lamina proxima*. La diffusion des granulomes aboutit à une entéropathie par perte de protéines, qui se traduit par des œdèmes et de l'hypoprotéïnémie due à la diminution de la pression osmotique. A terme, les cellules épithéliales de la muqueuse sont relarguées dans la lumière intestinale. Cette phase terminale se traduit par des diarrhées chroniques, des pertes d'hématies, des diminutions de la production de lait, des œdèmes diffus, des anémies, de l'infertilité et la mort. Une étude en Ecosse indique que d'un point de vue moléculaire, des souches de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* isolées de lapins sauvages, n'avaient aucunes différences avec celles isolées de bétail, ce qui indiquerait que ces animaux sauvages constitueraient un réservoir de contamination des troupeaux (Cocito *et al.* 1994). De plus, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ne se multiplie pas dans l'environnement, et nécessite l'infection d'un animal pour se multiplier (Thorel *et al.* 1990).

- *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum*

Historiquement, *M. avium* ssp. *silvaticum* est un pathogène aviaire qui est généralement associée à des pathologies chez les oiseaux sauvages (Anonymous 2004), et qui n'est pas isolé dans l'environnement, ce qui suggère la nécessité d'infecter l'animal pour cette sous-espèce (Thorel *et al.* 1990). La sous-espèce *silvaticum* du MAC a aussi pu être rencontrée dans des rares cas d'entérites chroniques chez les veaux (Legrand *et al.* 2000) et chez d'autres mammifères (Thorel *et al.* 1990).

I.1.h / Transmission de l'animal à l'homme

- Généralité

L'homme peut être contaminé par *M. avium* du sérotypes 1, 4, 6 et 8 (§ I.1.f /), et les animaux peuvent être contaminés par *M. avium* du sérotype 1, 2, 4, 5 et 8 (§ I.1.g /), ce qui suggère des transmissions potentielles de *M. avium* ssp. *avium* (sérototype 1 et 2) et *M. avium* ssp. *hominissuis* (sérototype 4, 5, 6 et 8).

- Transmission des porcs à l'homme

Chez le porc, les sérotypes 1, 2, 4, et 8 de *M. avium* peuvent être associés aux cas de liaisons tuberculeuses, et sont aussi isolés de cas humains, en particulier les sérotypes 1, 4 et 8 qui peuvent être rencontrés chez les patients atteints du SIDA (Straw *et al.* 1999). Au Pays Bas, une étude en 1996 sur l'augmentation des cas de contamination des porcs par *M. avium*, a indiqué, qu'en raison de la similarité à 75% des profils génétiques de la majorité des souches testées, le porc pouvait être l'un des vecteurs des infections à *M. avium* chez l'humain (Komijn *et al.* 1999). En accord avec cette hypothèse, une étude en Suède, arrive à la conclusion que la majorité des souches du MAC analysées, qu'elles soient d'origine humaine ou porcine, présentaient un profil génétique semblable (Ramasoota *et al.* 2001). Plus précisément, une étude comparative de souches de *M. avium* isolées d'humains en Allemagne entre 1999 et 2000 et isolées de porcs, indique que certains profils génétiques des souches d'origine humaine et animale, présentent de fortes similitudes pour la sous-espèce *M. avium* ssp. *hominissuis*, contrairement à *M. avium* ssp. *avium* qui n'a été isolé que chez l'animal (Möbius *et al.* 2006). En accord avec ces résultats, une étude finlandaise de comparaison de souches de *M. avium* provenant de cas cliniques humains et de mycobactérioses porcines, a observé dans ces deux groupes, des profils génétiques identiques à plus de 95% pour des souches de *M. avium* *hominissuis*, ce qui indiquerait une transmission inter-espèces probable ou une sources d'infection commune (Tirkkonen *et al.* 2007).

- Transmission des ruminants à l'homme

Récemment en 2004, une étude a mis en exergue l'existence des deux séquences alléliques, communes à des souches de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* isolées d'humains atteints de la maladie de Crohn et de bovins, de moutons et de chèvres, atteints de la maladie de Johne. Ces séquences alléliques, constituées pour l'une de 7 répétitions de G ainsi que de 4 répétitions de GGT, et pour l'autre de 7 répétitions G ainsi que de 5 répétitions de GGT, pourraient démontrer la transmission probable du pathogène entre l'homme et ces

animaux (Ghadiali *et al.* 2004). Néanmoins, la seule présence du germe ne peut à lui seul prouver qu'il est la cause de la maladie en question.

Par ailleurs en Allemagne, l'étude comparative de souches de *M. avium* isolées d'animaux et isolées d'humains entre 1999 et 2000, indique qu'en ce qui concerne les bovins des profils génétiques des souches d'origine humaine et animal, présentent de fortes similitudes pour la sous-espèce *M. avium* spp. *hominissuis*, contrairement à *M. avium* spp. *avium* qui n'a été isolé que chez l'animal (Möbius *et al.* 2006). Néanmoins, cette conclusion n'indique pas obligatoirement qu'il n'existe pas de transmission de *M. avium* spp. *avium* entre les bovins et l'homme car les sérotypes de 1 et 2 de *M. avium* spp. *avium* ont déjà été isolés du bovin (Thorel 1980), et le sérotype 1 et l'un des sérotypes rencontré chez l'homme (§ I.1.f /). Toutefois, les infections des bovins par *M. avium* ssp. *avium* et/ou ssp. *hominissuis*, ne présentent que des adénites et pas de lésions organiques. Le risque de transmission à l'homme par le bovin, présente donc un risque faible, comparativement au porc que présente des adénites, mais aussi des lésions organiques.

- Transmission des volailles à l'homme

La présence de *M. avium* ssp. *avium* peut être observée dans les élevages de basse-cour, et dans de très rare cas dans les élevages intensifs. Le risque de transmission à l'homme est donc très faible, d'autant plus que *M. avium* ssp. *avium* semble beaucoup moins virulente chez l'homme que ne l'est *M. avium* ssp. *hominissuis* (§ I.1.f /). Seul un rare cas de contamination des élevages intensifs de poules pondeuse par *M. avium* ssp. *avium*, a été observé. Effectivement, dans deux entreprises distinctes, *M. avium* ssp. *avium* du sérotype 2 a été détecté, et l'hypothèse a été émise selon laquelle la farine de viande du fournisseur unique aux deux élevages a probablement été à l'origine de la contamination (Schricke and Thorel 1980). Néanmoins, aucune étude ne fait référence à une probable transmission à l'homme de *M. avium* ssp. d'origine aviaire.

I.1.i / Voie d'exposition pour l'homme

- Eau potable

Selon la WHO (World Health Organization) et l'US-EPA (U.S. Environment Protection Agency), l'eau de consommation est un vecteur majeur des infections à MAC, qui par ailleurs a été reconnu comme un pathogène émergent dans l'eau en 2004.

(http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/pathmycobact/en/index.html)

Effectivement, une étude à Los Angeles, indique que l'eau potable peut être une voie de transfert de l'infection à *M. avium* pour les patients atteints ou non du SIDA et chez les personnes non hospitalisées (Aronson *et al.* 1999). De plus, malgré la capacité des traitements de l'eau comme la chlorure, la chloramine ou l'ozone ; à réduire de 2 à 4 log la quantité de *Mycobacterium*, il est avéré que ces bactéries ont la capacité de se multiplier dans le système de distribution de l'eau potable, d'autant plus que celle-ci est riche en substances organiques carbonées assimilables ou biodégradables (Falkinham *et al.* 2001; Le Dantec *et al.* 2002a). Effectivement, la résistance de *M. avium* et *M. intracellulare* à la chlorure est plus importante dans

le cas d'une croissance en biofilm, que dans le cas d'une croissance en suspension (Steed and Falkinham 2006). Par ailleurs et par opposition aux observations faites sur les systèmes de distribution d'eau dans les pays développés, les systèmes de distribution des régions en voie de développement, pourraient à priori être contaminées par des mycobactéries pathogènes non tuberculeuses autres que *M. avium* (September *et al.* 2004). Cela pourrait expliquer l'observation selon laquelle le degré d'immunisation au MAC est plus important dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (Fordham von Reyn *et al.* 1993). Néanmoins, le réseau de distribution d'eau de la ville de Paris présente des mycobactéries atypiques saprophytes comme les espèces *M. aurum*, *M. gadium*, *M. gordonae* et *M. nonchromogenicum*, ou potentiellement pathogènes comme les espèces *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* et *M. intracellulare* (Le Dantec *et al.* 2002b). Cette étude n'a pas identifiée de *M. avium*, mais indique que 51% des mycobactéries atypiques isolées, n'ont pas été identifiées. En Californie, une étude a détecté *M. avium* dans l'eau potable, et les a étudié par AFLP (amplified fragment length polymorphism) pour les comparer à des souches d'origine humaine et isolées d'aliments. Cette étude n'a pas détectée de profils génétiques semblables, mais a observé que la diversité génétique des souches isolées de l'eau potable, étaient beaucoup moins grande que celle observée pour les souches d'origine humaine ou issues d'aliments. Ceci a donc amené l'hypothèse selon laquelle les *M. avium* présents dans les réseaux d'eau potable, étaient sélectionnés par les traitements de l'eau (Pfaller *et al.* 2007). Pour ce qui est des infections pulmonaires, l'immunodéficience de l'hôte n'est pas toujours établie face aux infections à MAC. Effectivement, un cas non mortel d'infection des poumons par le MAC, a été rencontré chez une jeune étudiante ne présentant pas de signes d'immunodéficience, mais dont l'exposition à l'agent décrit généralement comme opportuniste, ces faites probablement via l'inhalation d'eau sous forme d'aérosols provenant d'un jacuzzi (Kahana *et al.* 1997).

- Alimentation

Cette étude en Californie (Pfaller *et al.* 2007), indique par ailleurs que les souches isolées de végétaux, présentaient plus de similitudes génétiques avec les souches d'origine humaine, que n'en avaient les souches isolées de l'eau potable. A Los Angeles, une étude sur la transmission à l'homme de *M. avium* via l'alimentation, indique que sur les 121 aliments analysés, 25 furent positifs aux mycobactéries ; soit un isolement global de 29 souches dont 12 se sont avérées être *M. avium* dans des brocolis, des épinards, des laitues à feuilles rouge, des salades emballées, des poireaux, des champignons et des choux. De plus, il a été démontré, qu'un profil génétique d'une de ces 12 souches de *M. avium*, fut identique à celui d'un isolat clinique humain, et que deux souches d'origine humaine présentaient des similitudes génétiques étroites avec deux souches d'origine alimentaire (Yoder *et al.* 1999).

- Environnement

Parmi les mycobactéries isolées de l'environnement, *M. avium* est la plus abondante, vient ensuite *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. parafortuitum* et *M. marinum* (Portaels 1995). Des bactéries du MAC sont ubiquitaires et en l'absence de transmissions inter-humaines connues, il semblerait que l'homme, au même titre que les animaux, soit contaminé par des *M. avium* du sol et des poussières, via des expositions par inhalation ou ingestion (Legrand *et al.* 2000). Des *M. avium* ont été effectivement isolées de cigarettes (Mijs *et al.* 2002), et *M. avium* a la capacité de persister dans le sol, les locaux et les équipements (Straw *et al.* 1999). Effectivement, une étude en Floride indique que le sol est un réservoir principale de *M. avium* associé avec les pathologies humaines, et que les personnes ayant des activités agricoles sont les plus exposées à l'infection. De plus, les régions à climat tempéré de la Floride se sont avérées être particulièrement à risque, car le sol ne s'y trouve pas gelé en hivers, et que les saisons d'agriculture y sont plus longue (Reed *et al.* 2006).

- Iatrogène

Chez un patient de 29 ans HIV négatif ayant subi une transplantation rénale, des symptômes de fièvre et de diarrhée ont été diagnostiqués 5 ans après l'intervention, et des *M. avium* ont été retrouvées dans le foie et l'intestin, alors que la recherche dans le rein de *M. avium* s'était révélée négative. Ce cas non mortel n'a pas été rattaché directement à une infection nosocomiale, mais en ce qui concerne la transplantation rénale, les infections par les mycobactéries non tuberculeuses mortelles dans 3% des cas, restent effectivement faibles mais présentes, avec une incidence de 480cas/100000 contre 13,1cas/100000 dans la population générale (Valerga *et al.* 2007). D'autre part, l'étude menée sur la prévalence de *M. avium* dans les réseaux de distribution d'eau potable d'hôpitaux de Los Angeles, indique que les étroites relations entre les souches cliniques et les souches issues du réseau, suggèrent de potentielles contaminations nosocomiales (Aronson *et al.* 1999).

I.2 / Les Méthodes de typage des *Mycobacterium avium*

I.2.a / Typage par RFLP1245-1311

- Principe

La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est une méthode commune pour le typage de *Mycobacterium*, qui nécessite une importante quantité d'ADN génomique et qui met en œuvre une analyse complexe des profils de fragments obtenus (Biet *et al.* 2005b). Cette méthode de Southern-blot, consiste à extraire et cliver spécifiquement le génome considéré par une ou plusieurs enzymes de restriction, puis à faire migrer les fragments résultant sur un gel d'agarose. Après cette séparation des fragments de restriction, un transfert de ces derniers est effectué sur une membrane de nylon afin de pouvoir être hybridés par une sonde complémentaire de régions spécifiques, qui est au préalable marquée par une enzyme, qui a la capacité de dégrader un substrat en produisant de la chimioluminescence. Ainsi cette lumière peut imprimer un film

auto-radiographique dans le but de révéler le profil génétique spécifique de la souche étudiée. La comparaison relative des profils constitués d'un ou plusieurs fragments hybridés à la sonde marquée, permet alors de différencier la structure génétique des bactéries.

- Normalisation

Actuellement, il existe plusieurs marqueurs pour les sous-espèces de *M. avium*, qui non pas la même faculté à cibler ces dernières (Figure 4).

| sous-espèces | éléments et séquences d'insertion | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|-----|------------------|--------|-------|------------------|-------|--------|--------|--------|
| | DT1 | DT6 | IS1245 | IS1311 | IS900 | IS901 | IS902 | IS1110 | IS1141 | IS1613 |
| <i>ssp. avium</i> et <i>ssp. hominissuis</i> | ± | + | + | + | - | ± * ² | + | + | - | + |
| <i>ssp. paratuberculosis</i> | ND | ND | - * ¹ | + | + | - | - | ND | - | - |
| <i>ssp. silvaticum</i> | ND | ND | + | + | - | + | + | ND | - | - |

ND : non déterminé ; + : présence ; - absence ; ± : présence variable (Legrand *et al.* 2000),

*¹(Collins *et al.* 1997; Johansen *et al.* 2005; Legrand *et al.* 2000), *²(Dvorska *et al.* 2004)

Figure 4 : Distribution des différents éléments et séquences d'insertion chez *Mycobacterium avium*

Parmi ces différentes séquences d'insertion pouvant être utilisées comme des sondes d'hybridation, la IS1245 et la IS1311, peuvent cibler à la fois *M. avium ssp. avium*, *M. avium ssp. hominissuis* et *M. avium ssp. silvaticum* (Legrand *et al.* 2000). Suite à la découverte de la séquence répétitive IS1245 chez *M. avium* (Guerrero *et al.* 1995), une proposition de standardisation de la méthode RFLP pour *M. avium* a été émise, en recommandant l'utilisation de la séquence d'insertion IS1245 comme sonde d'hybridation, et PvuII comme enzyme de restriction (van Soolingen *et al.* 1998), ce qui a été suivi par de nombreuses équipes (Bauer and Andersen 1999; Dvorska *et al.* 2004; Johansen *et al.* 2005; Johansen *et al.* 2007; Komijn *et al.* 1999; Matlova *et al.* 2005; Picardeau *et al.* 1997; Ritacco *et al.* 1998; Tirkkonen *et al.* 2007).

D'autre part, après la description d'une nouvelle séquence d'insertion nommée IS1311, qui présente 85% de similarité avec IS1245, une étude comparative menée sur *M. avium ssp. avium* et *M. avium ssp. hominissuis*, et utilisant PvuII comme enzyme de restriction, indique que la RFLP1311 donne des profils présentant moins de fragment qu'avec la RFLP1245, mais que face à cette interprétation plus simple, la RFLP1311 présentait un pouvoir de discrimination plus faible que la RFLP1245 (Johansen *et al.* 2007). Néanmoins, la combinaison des méthodes RFLP1245 et RFLP1311 utilisant PvuII comme enzyme de restriction, présente un pouvoir de discrimination plus important que chacune des deux méthodes prises séparément (Johansen *et al.* 2005; Johansen *et al.* 2007). Par ailleurs, il existe une séquence d'insertion IS1245 longue de 427pb, qui donne des hybridations croisées avec IS1311, alors qu'une autre séquence d'insertion IS1245 courte de 175pb, semble beaucoup plus spécifique et plus adaptée à l'étude taxonomique et épidémiologique du MAC par RFLP (Johansen *et al.* 2005). D'autre part, il est à noter que l'utilisation de la RFLP1245 combinée à la RFLP1311 en utilisant BstEII comme enzyme de restriction, est aussi apparue comme apte à l'étude taxonomique et épidémiologique du MAC (Collins *et al.* 1997).

I.2.b / Typage par VNTR-MIRUs

- Principe

La méthode de typage VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) repose sur le dénombrement de répétitions en tandem (Mazars *et al.* 2001; Supply *et al.* 2001), qui dans un cas particulier sont nommées MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) chez les mycobactéries. Le terme VNTRs fait référence aux répétitions de séquences complexes supérieures à 6pb nommées minisatellites. Ces minisatellites, comme les microsatellites constitués de séquences simples de 1 à 6pb, sont présents dans tous les organismes connus, des virus jusqu'au eucaryotes en passant par les procaryotes comme les mycobactéries. Ces répétitions de séquences simples ou complexes subissent des mutations, comme les délétions et les insertions de leurs séquences répétitives, qui conditionnent leur extension (Mazars *et al.* 2001; Screenu *et al.* 2007). Les MIRUs sont en fait des VNTRs particulières, qui procèdent des éléments de régulation de la transcription, comme le codon d'initiation ATG et les codons terminateurs TGA, TAA, TAG, ou des éléments régulateurs de la traduction comme les sites d'attache du ribosome bactérien 5'-TGA GGA GGA GC-3' (Romano *et al.* 2005). De plus, les éléments de répétitions MIRUs mesurent de 40 à 100pb et sont intercistroniques, c'est à dire qu'ils se situent entre ou à l'intérieur de gènes (Supply *et al.* 1997). En pratique, le dénombrement de séquences répétées en tandem passe par l'utilisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction), qui amplifie des loci comportant ces séquences répétées en tandem, afin d'en déduire leurs tailles. Connaissant pour un locus amplifié, la taille de la séquence répétée afférente, ainsi que la taille des régions amplifiées qui n'intègrent pas la répétition en tandem, il est donc possible de déterminer le nombre de séquences répétées en tandem pour un locus donné de la souche analysée.

- Normalisation

La majorité des applications et du développement du typage VNTR-MIRUs, ont porté sur l'étude épidémiologique de *M. tuberculosis*, qui est l'agent de la tuberculose chez l'homme. Effectivement, la structure des MIRUs chez *M. tuberculosis* est initialement apparue comme semblable à un minisatellite humain nommé MSY1 sur le chromosome Y. De plus, chez *M. tuberculosis* 31 loci présentant des VNTR ont été identifiés, dont 12 se sont avérés polymorphes (Supply *et al.* 2000). Une étude proposant le typage VNTR-MIRUs sur ces 12 loci pour l'analyse des épidémies de *M. tuberculosis*, est arrivée à des résultats proches du typage RFLP6110, qui est une méthode de typage commune pour le germe en question (Mazars *et al.* 2001). Une application d'automatisation par PCR multiplex, couplée à un marquage fluorescent de l'une des paires d'amorces de PCR pour chaque locus analysé, a démontré que la méthode appliquée à ces 12 VNTRs semblables à des VNTRs de mammifères, présentée 100% de reproductibilité, de sensibilité et de spécificité pour *M. tuberculosis* (Supply *et al.* 2001). Plus récemment, les méthodes de typage RFLP6110 et VNTR-MIRUs sur 24 loci, appliquées à l'étude épidémiologique de cas de tuberculose à Hambourg en 2003, ont permis de démontrer que seul des profils semblables avaient une relation épidémiologique (Oelemann *et*

al. 2007). Actuellement, la méthode de typage VNTR-MIRUs a été proposée sur 15 loci pour l'étude des épidémies à *M. tuberculosis*, et sur 24 loci pour les études phylogéniques de ce germe (Supply *et al.* 2006).

En vue de développer une méthode de typage pour *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, plus simple que la méthode commune RFLP basée sur la séquence d'insertion IS900 uniquement rencontrée chez cette sous-espèce de *M. avium*, une étude a testé une méthode VNTR-MIRUs basée sur l'identification de 35 loci. Après amplification PCR de ces loci sur 72 souches, 8 loci se sont avérés polymorphes. De plus pour le typage de *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, cette étude a conclu que cette méthode VNTR-MIRUs pouvait apporter une discrimination additionnelle à la RFLP900 en passant d'un indice de discrimination de 0,283 pour la RFLP900 à 0,789 pour la VNTR-MIRUs ; soit 0,833 pour la combinaison des deux méthodes (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007).

II / Matériels et Méthodes

II.1 / Situation expérimentale

L'étude a exploité une collection de souches rassemblées par le LERPAZ (Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses) de l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) depuis plusieurs décennies. Afin d'analyser la plus grande variété possible de *M. avium*, il a été sélectionné dans la collection, 140 souches de *M. avium* ssp. *avium*, ou ssp. *hominissuis* et 5 souches de *M. avium* ssp. *silvaticum*, présentant des effets pathologiques, des origines géographiques et des origines animales diverses. Il est à noter que la souche *M. avium* ssp. *avium* de référence ATCC 25291 (Agence American Type Culture Collection) a été intégrée à l'étude. Il a été retenu pour cette étude des souches provoquant des lésions circonscrites ou généralisées dans des élevages de porcs, des souches provoquant des lésions évocatrices de tuberculoses bovines dans des élevages bovins, des souches provoquant des lésions de divers degrés dans des élevages de volailles, chez des oiseaux sauvages, chez des mammifères sauvages ou domestiques, ainsi que des souches issues de l'environnement. D'autre part, 23 souches de *M. avium* ssp. *avium*, ou ssp. *hominissuis* d'origine humaine, fournies par l'Institut Pasteur à Paris, ont été utilisées pour l'étude. Ces souches isolées de cas cliniques en France entre 2000 et 2005, intègrent des souches issues de patients immunocompétents et des souches issues des patients HIV positifs. L'ensemble des 168 souches (Figure 5), a été caractérisé par la méthode de typage moléculaire commune des *M. avium* : la RFLP sur les séquences d'insertion IS1245 et IS1311, ainsi que par une méthode de typage innovante : la VNTR-MIRUs sur 8 loci polymorphes, développée initialement pour *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007).

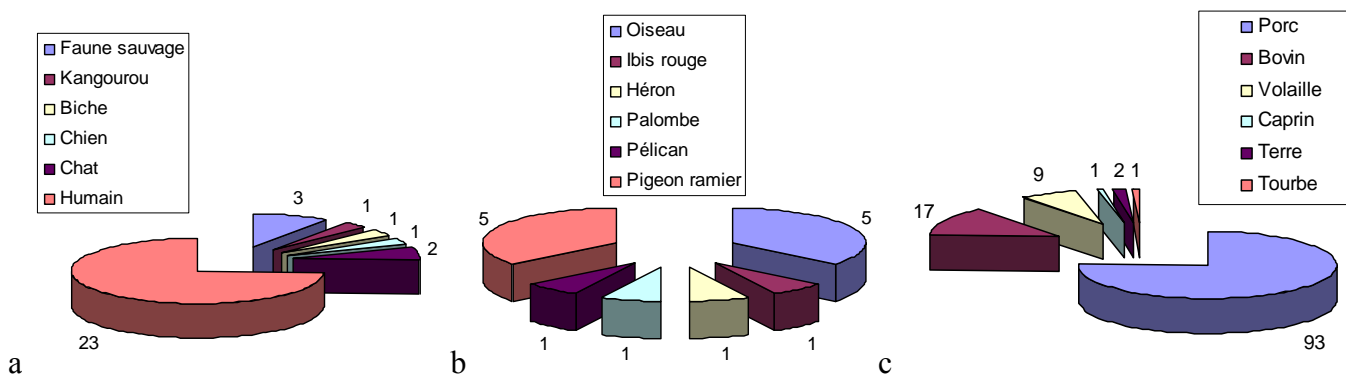


Figure 5 : Répartition des 168 souches de *M. avium* typées par RFLP1245-1311 et VNTR-MIRUs sur 8 loci, et isolées de mammifères comme l'homme, les animaux sauvages et domestiques (a), d'oiseaux (b), ainsi que d'animaux d'élevage et d'environnement d'élevage (c)

II.2 / Procédure expérimentale

II.2.a / Mise en culture des souches

Les souches de *M. avium* conservées en cryotube à -20°C , avaient été isolées via la méthode NF U 47-104 « Isolement et identification des mycobactéries autres que *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* chez l'animal », qui intègre des prétraitements par H_2SO_4 à 4% ou NaOH à 4% selon la nature du prélèvement, et un isolement sur milieu solide Löwenstein-Jensen et Coletsos (Annexe 9), suivi d'une confirmation de l'espèce en fonction des caractéristiques de croissance (Annexe 1) et des caractéristiques biochimiques (Annexe 2). Ces souches de *M. avium* ont été remises en culture à $+37^{\circ}\text{C}$ jusqu'à obtention d'un trouble opaque, en inoculant par 1ml ; 10ml de milieu liquide Middlebrook 7H9 (Annexe 9) non supplémenté en mycobactine pour les souches supposées appartenant aux sous-espèces *avium* et *hominissuis*, et supplémenté en mycobactine pour les souches de la sous-espèce *silvaticum* isolées de pigeon.

II.2.b / Identification des sous-espèces

- Extraction d'ADN

Après obtention d'une culture cellulaire dense (§ II.2.a /), environ 10ml de celle-ci a été centrifugée à 3000rpm pendant 20min à température ambiante. En suite, le culot a été repris dans 1ml de tampon TE 1X (Tris-Acide EthylèneDiamine-Tétracétique : 10mM Tris pH 7,6 ; 1mM EDTA), qui a été centrifugé à 13000rpm pendant 10min à température ambiante afin de reprendre le nouveau culot dans 400 μl de tampon TE 1X. Une digestion de ces cellules a été effectuée par 50 μl de lysozyme à 10mg/ml à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant environ 12h sous agitation à 650rpm, puis par 70 μl de SDS à 10% (Sodium Dodecyl Sulphate) additionné de 5 μl de protéinase K à 10mg/ml à $+65^{\circ}\text{C}$ pendant 10min sous agitation à 650rpm. Ainsi, la force ionique a été augmentée par adjonction de 100 μl de NaCl à 5M, et les débris cellulaires ont été décrochés par adjonction de 100 μl du détergent CTAB/ NaCl (Bromure d'HexadécylTriméthylAmmonium) à 10%/0,7M préchauffé à $+65^{\circ}\text{C}$. Suite à une incubation à $+65^{\circ}\text{C}$ pendant 10min sous agitation à 650rpm, la solubilisation de l'ADN

en phase aqueuse a été effectuée par l'ajout de 750µl de chloroforme isoamyl (24/1). Le transfert de l'ensemble de la solution dans un tube Phase Lock Gels 5'-3' préalablement centrifugé à 13000rpm pendant 2min, puis l'agitation de ce tube pendant 10s et la centrifugation à 13000rpm pendant 10min de ce dernier, ont permis de récupérer la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN. L'adjonction de 450µl d'isopropanol à cette phase aqueuse a permis de précipiter l'ADN sous forme d'une pelote. Après au moins 30min à -20°C et une centrifugation à 13000rpm pendant 15min à +4°C, le surnageant a été éliminé et remplacé par 200µl d'éthanol 70% froid. Ainsi une centrifugation à 13000rpm pendant 15min à +18°C a permis de culotter l'ADN lavé, et une évaporation totale de l'éthanol a été effectuée à +37°C. Ainsi l'ADN a été repris dans 51µl de tampon TE à 1X (Tris-Acide EthylèneDiamine-Tétracétique). Pour finir la solution d'ADN a été incubée à +37°C pour solubilisation totale de l'ADN avant conservation à +2°C. Pour normaliser les concentrations, un microlitre d'ADN a été dosé par un spectrophotomètre Biophotometer de chez Eppendorf sous UV à 260nm, en parallèle d'une électrophorèse sur un gel à 0,8% d'agarose Seakem LE, préparés dans du tampon TBE (Tris-Borate-Acide EthylèneDiamine-Tétracétique) à 1X (Tris 10mM pH 8,0 ; acide borique 89mM ; EDTA 2mM) et additionné de BET (Bromure d'Ethidium) à hauteur d'environ 6mg/ml de gel (dépôt : 2µl d'extrait d'ADN pur + 8µl d'eau + 2µl de LB (Loading Buffer) à 5X ; appareillage : § suivant). Ainsi, la concentration des extraits d'ADN a été normalisée à une concentration d'environ 50ng/µl par ajustement avec du tampon TE 1X.

- Amplification par PCR

Les souches de la sous-espèce *silvaticum* ont été sélectionnées en optant pour des souches dépendantes à la mycobactine et isolées de pigeon. Quant-aux sous-espèces *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis*, leur identification a été effectuée par PCR en recherchant la séquence d'insertion IS1245, qui est présente pour *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis* ; ainsi que la séquence d'insertion IS901, qui est présente pour *M. avium* ssp. *avium*, mais absente pour *M. avium* ssp. *hominissuis* (§ I.1.b /). Afin de réaliser une PCR sur le génome de ces souches ; 2µl des extraits d'ADN ont été utilisés dans 23µl de mix-PCR ; constitué de 13,2µl d'eau ultra pure ; 2,5µl de tampon 10X ; 0,2µl de dNTPs à 25mM (di-Nucléotide Tri-Phosphate) ; 1µl d'amorce sens et anti-sens à 20pmol/µl pour les séquences d'insertion IS901 et IS1245 (Annexe 10) ; 5µl de tampon Q et 0,1µl de Taq Hot start de chez Qiagen. Suite aux amplifications par un thermocycleur My Cycler de chez Biorad ou PCR System 9700 de chez Eppendorph (Figure 6), 5µl du marqueur de taille 100pb DNA Ladder Plus de chez Fermentas (100pb, 200pb, 300pb, 400pb, 500pb, 600pb, 700pb, 800pb, 900pb, 1000pb, 1200pb, 1500pb, 2000pb, 3000pb), ainsi que 10µl des 25µl de volume réactionnel additionnés de 5µl de LB 5X, ont été déposés sur des gels à 2% d'agarose Seakem LE préparés dans du tampon TBE 1X et additionnés de BET à hauteur d'environ 6mg/ml de gel. Les migrations par électrophorèse ont été effectuées à environ 120mV dans un tampon de TBE 1X et la photographie du gel a été obtenue par un appareillage Gel doc 2000 de chez Biorad, muni du logiciel d'acquisition d'image Quantity one 4.2.1.

| | Phases | Températures (°C) | Temps |
|-----------------------------|--------|------------------------------|-------|
| activation de la polymérase | 1 | 94 | 15min |
| dénaturation | 2 | 94 | 1min |
| hybridation | 3 | 64 | 30s |
| synthèse | 4 | 72 | 2min |
| amplification exponentielle | 5 | Répétition x 4 à la phase 2 | |
| dénaturation | 6 | 94 | 1min |
| hybridation | 7 | 60 | 1min |
| synthèse | 8 | 72 | 2min |
| amplification exponentielle | 9 | Répétition x 34 à la phase 6 | |
| synthèse | 10 | 72 | 10min |
| | 11 | 15 | ∞ |

Figure 6 : Cycle PCR de la polymérase Hot start utilisée pour amplifier les séquences d'insertion IS901 et IS1245 en vue de différencier les sous-espèces *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis*

II.2.c / Typage par RFLP1245-1311

En vue de la majorité des études utilisant la RFLP pour étudier *M. avium* (§ I.2.a /), il a été utilisé séparément les séquences d'insertion IS1245 et IS1311 pour hybrider le génome clivé par PvuII.

- Préparation des fragments d'hybridation

Les amorces des fragments d'hybridation IS1245 et IS1311 ont permis de créer ces derniers sur le génome d'une souche de *M. avium* ssp. *avium* (N d'ordre 1995.02491.00) par amplification PCR (Annexe 10), avec la Hot start comme polymérase, et sous les mêmes conditions que lors de l'identification de la sous-espèce (§ II.2.b /).

- Marquage des fragments d'hybridation

Suite à la purification des produits de PCR obtenus, via le kit QI Aquick de chez Qiagen, les fragments IS1245 et IS1311 (10µl à 10ng/µl) ont été marqués par une enzyme avec le kit Amersham (ECL Direct Labeling and Detection System de chez General Electric Healthcare. Ainsi pour chaque membrane devant être hybridée, une peroxydase (10µl) a été fixée à la sonde dénaturée (5min à ébullition et 5min dans la glace) via des liaisons covalentes engendrées par du glutaraldéhyde (10µl) et une incubation à +37°C pendant 10min. Ces 30µl de sondes marquées ont été conservés à -20°C dans du glycérol à 50% final.

- Restriction du génome

Après ajustement avec du tampon TE 1X de la concentration des extraits d'ADN à environ 50ng/µl (§ II.2.b /), la restriction enzymatique d'environ 6h à +37°C, a été réalisée en additionnant 24,7µl d'extrait d'ADN normalisé ; 3µl de Buffer 4 à 10X ; 0,3µl de BSA (Sérum Albumine Bovine) à 10µg/µl et 1µl d'enzyme de restriction PvuII (Figure 7) à 10U/µl de chez Promega. La qualité de la restriction a été vérifiée par une électrophorèse sur un gel à 0,8% d'agarose Seakem LE préparés dans du tampon TBE 1X et

additionné de BET à hauteur de 6mg/ml de gel (2 μ l d'extrait d'ADN pur + 4 μ l d'eau + 2 μ l de LB 5X ; appareillage : § II.2.b /).



Figure 7 : Site de clivage par coupe franche de l'enzyme de restriction PvuII

- Migration des fragments de restriction

Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse à environ 50V pendant la nuit dans 280ml d'un gel à 0,8% d'agarose Seakem LE (15cmx20cm), préparés dans du tampon TBE 1X et additionné de BET à hauteur d'environ 6mg/ml de gel. Les dépôts des échantillons de restriction ont été de 17 μ l des 30 μ l de volume réactionnel soit environ 1 μ g d'ADN/puits, additionnés de 5 μ l de LB 5X (appareillage : § II.2.b /). Les distances de migration ont été standardisées via 12 μ l du marqueur de taille « 1kb plus » de chez Invitrogen dilué à 0,1 μ g/ μ l (20kb ; 10kb ; 7kb ; 5kb ; 4kb ; 3kb ; 2kb ; 1,5kb ; 1kb ; 0,7kb ; 0,5kb ; 0,4kb ; 0,3kb ; 0,2kb ; 75pb). Ainsi pour permettre les comparaisons inter-gels, la migration a été arrêtée pour une migration de 14,5cm du fragment de 1kb du marqueur de taille.

- Transfert sur membrane des fragments de restriction

Après avoir cassé les fragments d'ADN sous UV à 254nm pendant 5min, le gel a été trempé dans 350ml de solution de dénaturation (1,5M NaCl ; 0,5M NaOH) pendant 30min sous agitation, puis deux fois 15min dans 250ml de solution neutralisante (1,5M NaCl ; 0,5M de Tris HCl ; pH 7,5) sous agitation. Le transfert des fragments d'ADN du gel vers une membrane de chez Nytran 0,45 μ m de chez Schleicher-Schuell a été effectué avec une méthode active par pompage pour des transferts pendant la journée et avec une méthode passive par capillarité pour des transferts pendant la nuit (Figure 8). Au préalable du transfert, les membranes ont été stabilisées par un trempage rapide dans de l'eau, puis par un trempage de 10min dans du SSC 10X pour la méthode passive, ou dans du SSC 2X pour la méthode active (SSC **20X** : 3M NaCl ; 0,3M Na₃C₆H₅O₇ ; pH 7,0 de Eppendorph).

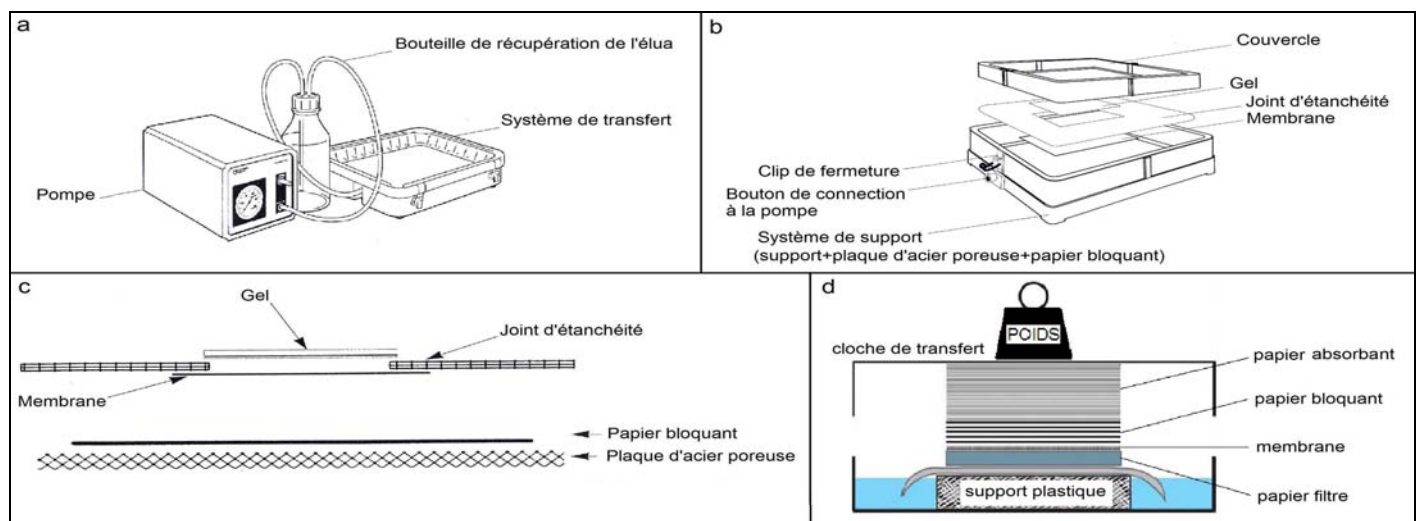


Figure 8 : Dispositif du transfert actif sous vide (a, b et c) et du transfert passif par capillarité (d)

Le dispositif par transfert sous vide a fait intervenir une unité de transfert TransVac et du papier bloquant de chez Pharmacia Biotech. Le montage effectué, le transfert sous vide a été réalisé à environ 60mbar par passage de 50ml de SSC 10X pendant 3h, renouvelé une seconde fois pour une membrane de 17cmx22cm.

Le dispositif par transfert passif a fait intervenir un poids de 750g, de l'essuie-mains comme papier absorbant (120 feuilles), et du papier Wattman comme papier filtre (2 feuilles à 20X de SSC) et bloquant (4 feuilles à 10X de SSC). Le transfert pendant la nuit c'est effectué via du SSC 20X comme tampon capillaire pour une membrane de 15cmx20cm.

Suite au transfert, la membrane a été lavée dans du SSC 6X, séchée partiellement à +37°C, puis les UV d'un Stratalinker 1800 crosslinker de chez Stratagene ont permis de fixer l'ADN avant conservation à +4°C ou -20°C.

- Hybridation des fragments de restriction

Après préchauffage de la solution d'hybridation à +42°C (tampon du constructeur ajusté à 0,5M NaCl ; 5% p/v d'agent bloquant : kit Amersham ECL Direct Labeling and Detection System de chez General Electric Healthcare), environ 25ml ont été utilisés par membrane. Afin de bloquer les zones sans ADN de la membrane, une pré-hybridation a été effectuée à +42°C pendant 1h des 25ml de liquide d'hybridation accompagnés de la membrane dans un four Isotemp de chez Fisher Scientific. Ainsi, pour chaque membrane, l'adjonction au liquide d'hybridation de 60µl de sondes glycérolée, a déclenché l'hybridation à +42°C pendant une nuit.

- Lavage de la membrane

Afin d'éliminer de la membrane les sondes marquées non hybridées, celle-ci a été lavée deux fois 20min sous agitation à +55°C dans environ 500ml solution de lavage 1 préchauffée à +55°C (0,4% SDS ; 0,5X SSC), puis deux fois 10min sous agitation à température ambiante dans environ 500ml solution de lavage 2 (SSC 2X).

- Déclanchement de la chimioluminescence

Après drainage de l'excès de liquide de la membrane, 30ml (50/50) des deux substrats de la peroxydase ont été additionnés à la membrane pour une incubation d'une minute à température ambiante, qui a permis à la peroxydase accrochée à la sonde de créer de la lumière en dégradant ces deux substrats (Figure 9). Il est à noter que ces 30ml de volume réactionnel ont été utilisés successivement pour le traitement de deux membranes.

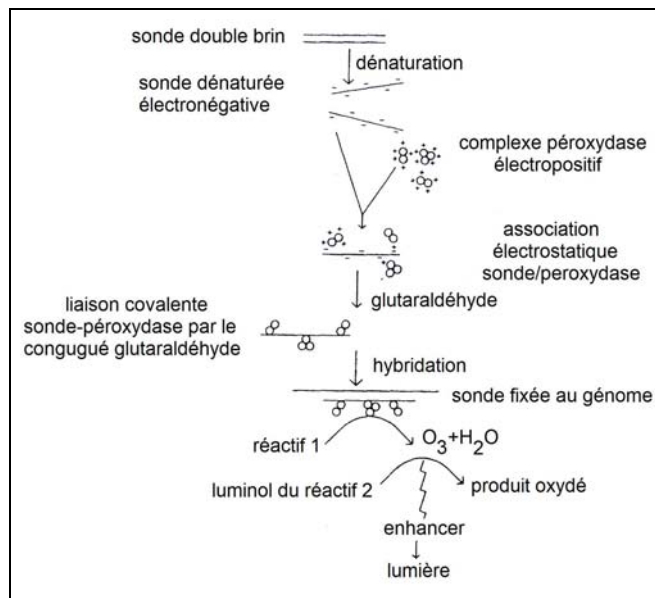


Figure 9 : Principe du système ECL de marquage et de détection de sonde de chez Amersham

- Révélation des profils

Après drainage de l'excès liquide des membranes, celle-ci a été enveloppée dans un film plastique, puis placée dans une cassette avec un film auto-radiographique Hyperfilm ECL de chez Amersham Biosciences pendant 5 à 15min, puis le film photographique exposé a été successivement trempé dans un bain de révélation de chez Kodak pendant 5min, dans un bain d'eau pendant quelques secondes, puis dans un bain de fixateur de chez Kodak pendant au moins 5min.

II.2.d / Typage par VNTR-MIRUs

- Extraction d'ADN

A partir de la culture en tube liquide (§ II.2.a /), 1ml a été chauffé à +80°C pendant 1h pour inactiver les cellules. En suite, le culot cellulaire obtenu par centrifugation à 13000rpm pendant 5min, a été lavé deux fois dans 500µl de tampon TE 1X, puis re-suspendu dans 100µl de tampon TE 1X, pour créer un choc thermique et obtenir des extraits d'ADN.

- Amplification des répétitions en tandem

Le typage VNTR-MIRUs a été effectué sur 8 loci, conformément aux résultats de l'étude qui les a identifiés comme polymorphes suite à une analyse exostose de loci présentant des TR (Tandem Repeats) chez la souche *M. avium* ssp. *paratuberculosis* de référence K10 (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007). Les amplifications des loci présentant les MIRU 292 et X3, ainsi que les VNTR 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Annexe 11), ont été réalisées par le biais de leurs amorces PCR respectives (Annexe 10). L'ensemble de ces PCR a été effectué en additionnant 2µl des extraits d'ADN à 23µl de mix-PCR ; constitué de 10,7µl d'eau ultra pure ; 5µl de tampon Greencolor 5X ; 0,2µl de dNTPs à 25mM ; 1µl d'amorce sens et anti-sens à 20pmol/µl ; 5µl de tampon Q et 0,1µl de Go taq de chez Promega. Il est à noter que pour le locus X3, le volume de tampon Q n'a pas été utilisé et a été remplacé par de l'eau ultra pure. Suite aux amplifications par

thermocycleur (appareillage : § II.2.b / et cycles Figure 10), 5µl du marqueur de taille 100pb DNA Ladder Plus de chez Fermentas (100pb, 200pb, 300pb, 400pb, 500pb, 600pb, 700pb, 800pb, 900pb, 1000pb, 1200pb, 1500pb, 2000pb, 3000pb), ainsi que 7µl des 25µl de volume réactionnel, ont été déposés sur des gels à 2% d'agarose NuSieve GTG/Seakem GTG (50/50) préparés dans du tampon TBE 1X et additionnés de BET à hauteur d'environ 6mg/ml. Il est à noter qu'une augmentation de la résolution a été effectuée en utilisant des gels à 4% d'agarose Metaphore/Seakem (50/50) notamment pour le locus 32, qui présente des unités de répétition en tandem à faible nombre de base. Les migrations et les prises de vue ont été réalisées dans les mêmes conditions que l'identification par amplification PCR (§ II.2.b /).

| | Phases | Températures (°C) | Temps |
|-----------------------------|--------|------------------------------|-------|
| activation de la polymérase | 1 | 94 | 5min |
| dénaturation | 2 | 94 | 30s |
| hybridation | 3 | 58 | 30s |
| synthèse | 4 | 72 | 30s |
| amplification exponentielle | 5 | Répétition x 40 à la phase 2 | |
| synthèse | 6 | 72 | 7min |
| | 8 | 15 | ∞ |

Figure 10 : Cycle PCR de la polymérase Go taq utilisée pour amplifier les MIRUs des loci 292 et X3, ainsi que les VNTR des loci 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 des sous-espèces *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*

Le dénombrement de TR pour chacun des loci, a été effectué en déterminant la taille des fragments amplifiés via le marqueur de taille, et en utilisant une table de conversion des tailles d'amplicons obtenus en nombre de TR (Annexe 12). La création de cette table de correspondance entre la taille du fragment d'amplification obtenu et le nombre de TR pour un locus donné, est basée sur le postula que la taille des régions flanquantes, intégrant l'amplicon mais n'intégrant pas les répétitions, reste constante entre *M. avium* ssp. *avium* ; *M. avium* ssp. *hominissuis* ; *M. avium* ssp. *silvaticum* et la souche de référence *M. avium* ssp. *paratuberculosis* K10, sur laquelle la méthode a été développée (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007).

II.3 / Participants

La réalisation de l'étude a fait appel à la complémentarité du LERPAZ de l'Afssa et de l'unité UR 1282, Infection Animale de l'INRA (Institut Nationale de Recherche Agronomique) Centre de Tours, qui vient de mettre en place la méthode de typage VNTR-MIRUs sur 8 loci spécifique à *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007). La technologie a été transférée dans le laboratoire pour cette étude d'application aux espèces *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*. Effectivement, les deux laboratoires travaillent en collaboration depuis 5 ans et sont associés dans deux programmes européens, dont l'un, VENoMYC (Veterinary Network of Laboratories

Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial diseases), finance des stages d'entraînement inter-laboratoires (<http://www.ucm.es/info/venomyc/>).

II.4 / Traitement des résultats

II.4.a / Comparaison des profils génétiques des souches

La comparaison des souches a été effectuée en appliquant le logiciel BIONUMERICS version 3.0 de 1998-2005, aux profils génétiques obtenus par les méthodes de typage VNTR-MIRUs sur 8 loci et RFLP1245-1311, afin d'obtenir pour chaque méthodes des dendrogrammes représentatifs des distances génétiques entre les souches de *M. avium* étudiées. Il est à noter que les profils VNTR-MIRUs ont été comparés par le coefficient multi-états sans tolérance, et qu'en accord avec l'expérience du LERQAP de l'Afssa de Maisons-alfort (Laboratoire d'Etude et de Recherche sur la Qualité des Aliments et des Procédés), les profils RFLP ont été comparés par le coefficient de Dince avec une optimisation à 2% (% de différence entre les positions relatives des bandes de deux profils considérés comme identiques) et une tolérance de 2% (% de différence entre les positions relatives de deux bandes considérées comme identiques sur deux profils distincts). Pour la RFLP, le marqueur de taille utilisé dans l'étude a été corrélé au marqueur de taille interne de BIONUMERICS. Par ailleurs, les dendrogrammes construits sont du type UPGMA (Unweighted Pair Group Matching by An. Arithmetic Averages Algorithm). De plus, ce logiciel a été utilisé pour créer les représentations en trois dimensions des distances génétiques existantes entre les profils formés à partir du typage des souches étudiées.

II.4.b / Comparaison des méthodes de typage

Le pouvoir de discrimination représente la probabilité d'analyser comme différentes deux souches distinctes. Afin de comparer les méthodes entre elles, le pouvoir de discrimination a été calculé pour la méthode de typage VNTR-MIRUs sur 8 loci, la méthode de typage RFLP1245-1311, et pour la combinaison de ces méthodes, via l'utilisation de la formule suivante (Hunter and Gaston 1988) :

$$DI = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j (n_j - 1) \right]$$

- DI : indice de discrimination
- N : nombre total de souches de l'étude
- n_j : nombre de souches présentant un profil semblable pour le $j^{\text{ème}}$ profils
- s : nombre total de profils identifiés

III / Résultats et discussion

III.1 / Identification des sous-espèces par PCR

L'ensemble des amplifications des séquences d'insertion IS1245 et IS901 n'est pas présenté, mais a permis de différencier, pour les souches intégrées à l'étude, les *M. avium* ssp. *avium* des *M. avium* ssp. *hominissuis*. Effectivement, toutes les souches testées présentes l'élément d'insertion IS1245, ce qui permet d'exclure l'espèce *intracellulare*. En ce qui concerne IS901, ces identifications ont permis de mettre en évidence dans la collection de souche de l'étude 30 *M. avium* ssp. *avium*, 69 *M. avium* ssp. *hominissuis* et 64 souches présentant une amplification nette de IS1245, mais une amplification faible de IS901 (Figure 11). Cette sous-espèce sera nommée par la suite *M. avium* ssp. ?. Il est à noter que les 5 souches *M. avium* ssp. *silvaticum* présentent une amplification de IS901 comparable à celle obtenues chez la souche de référence ATCC 25291 de *M. avium* ssp. *avium*.

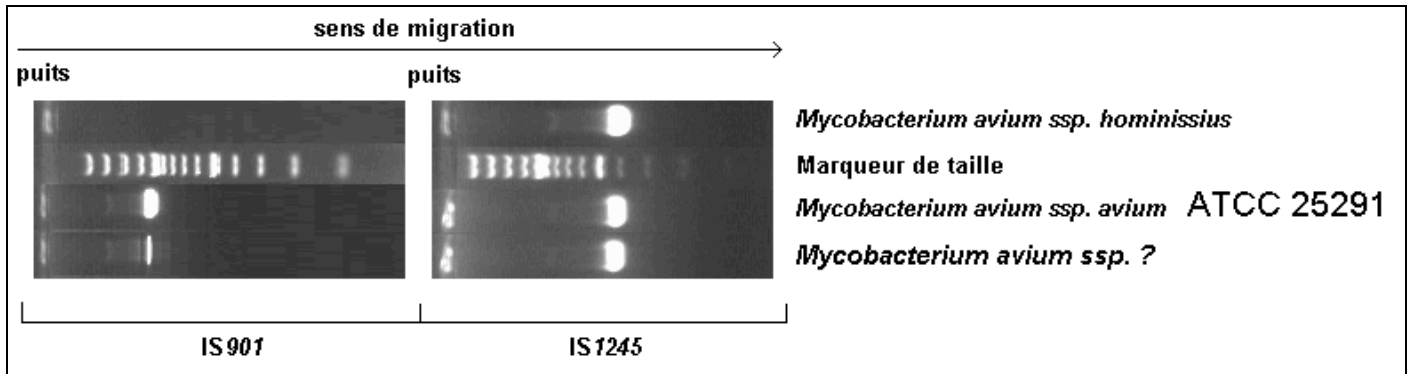


Figure 11 : Recherche de la présence des éléments d'insertion IS1245 et IS901 pour différencier la sous-espèce *M. avium* ssp. *avium* de la sous-espèce *M. avium* ssp. *hominissuis*

Sur l'ensemble des souches de l'étude, la présence ou l'absence de IS901 ne semble pas être clairement fonction de l'origine de la souche (Figure 12). Néanmoins, il est remarquable que la présence de IS901 est clairement avérée chez *M. avium* isolé des oiseaux.

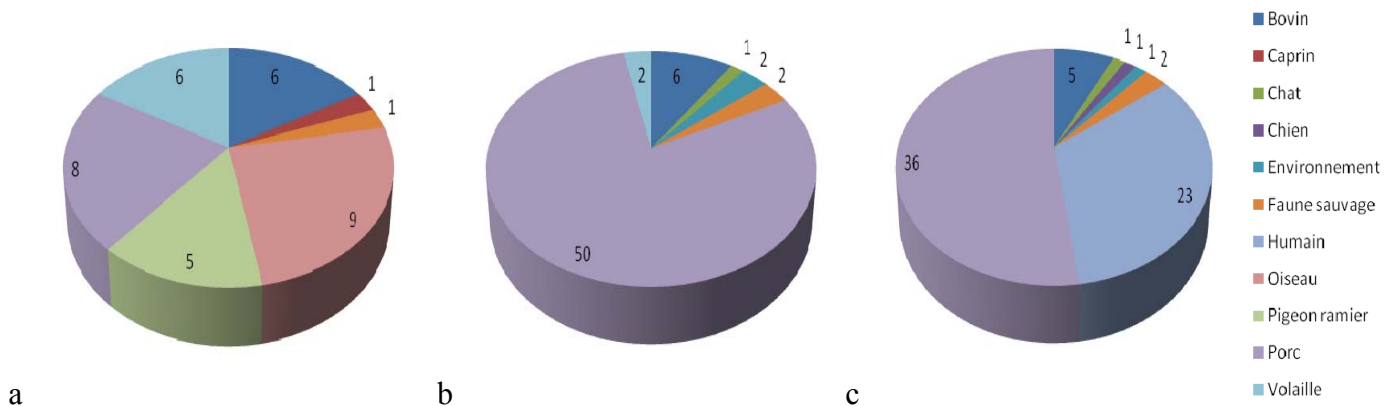


Figure 12 : Proportion des souches par origine, présentant une amplification de IS901 forte (a), faible (b) ou absente (c) comparativement à la souche *M. avium* ssp. *avium* de référence ATCC 25291

Effectivement, la présence d'une amplification nette de *IS901* est observable pour des souches issues de mammifères d'élevage (porc, bovin, caprin), d'animaux sauvages et d'oiseaux (oiseau, pigeon, volaille). Les amplifications faibles de *IS901*, tout comme les absences d'amplification de *IS901*, sont quant-à elles observées pour des souches issues de mammifères et de l'environnement d'élevage (porc, bovin), d'animaux sauvages, d'animaux domestiques et d'animaux d'oiseaux (oiseau, volaille). Néanmoins, une particularité apparaît du fait que l'ensemble des souches d'origine humaine ne présente pas d'amplification de *IS901*. Ceci est en accord les résultats en Allemagne (Möbius *et al.* 2006) où les 45 souches d'origine humaine ont été identifiées *M. avium* ssp. *hominissuis* (*IS901*-), en accord avec l'étude Finlandaise (Johansen *et al.* 2007) où les 37 souches d'origine humaine ont été identifiées *M. avium* ssp. *hominissuis* (*IS901*-), et en accord partiel avec une autre étude (Ritacco *et al.* 1998) où 63 souches d'origine humaine ont été identifiées *M. avium* ssp. *hominissuis* (*IS901*-), et une souche *M. avium* ssp. *avium* (*IS901*+).

III.2 / Typages VNTR-MIRUs

III.2.a / Répétitions en tandem obtenues pour chaque locus

Sur l'ensemble des sous-espèces *avium*, *hominissuis* et *silvaticum* typées par VNTR-MIRUs et en accord avec la table de conversion issue du développement de la méthode sur la sous-espèce *paratuberculosis* (Annexe 12), différents allèles ont été observés pour chacun des loci analysés (Figure 13). Effectivement, dans la majorité des cas un fragment correspondant à un nombre de TR prévisible, a été détecté. Ceci est le cas pour le loci 292 (TR=0 ; 2 ou 3), le locus X3 (TR=1 ; 2 ; 3 ; 4 ou 5), le locus 25 (TR=1 ; 2 ; 3 ou 4), le locus 47 (TR=2 ou 3), le locus 3 (TR=1), le locus 7 (TR=1), le locus 10 (TR=1 ; 2 ; 3 ou 5) et le locus 32 (TR=5 ; 7 ; 8 ou 9). Néanmoins, pour chacun des loci analysés, des amplifications apparaissent négative (TR= -) pour certaines souches. De plus, certaines amplifications ont donné des doubles fragments correspondant à des TR prévisibles. Ceci est le cas pour le locus 292 (TR=0 et 2) ; le locus 25 (TR=2 et 3) ; le locus 47 (TR=2 et 3) et le locus 10 (TR=1 et 2). Par ailleurs, deux souches d'origine humaine (2007.1257 et 2007.1270) présentent pour le locus 10, un fragment d'amplification non prévu par la table de conversion (TR= X), dont la taille est d'approximativement 275pb, c'est à dire un fragment d'une taille comprise entre les fragments représentatifs des TR=1 et TR=2.

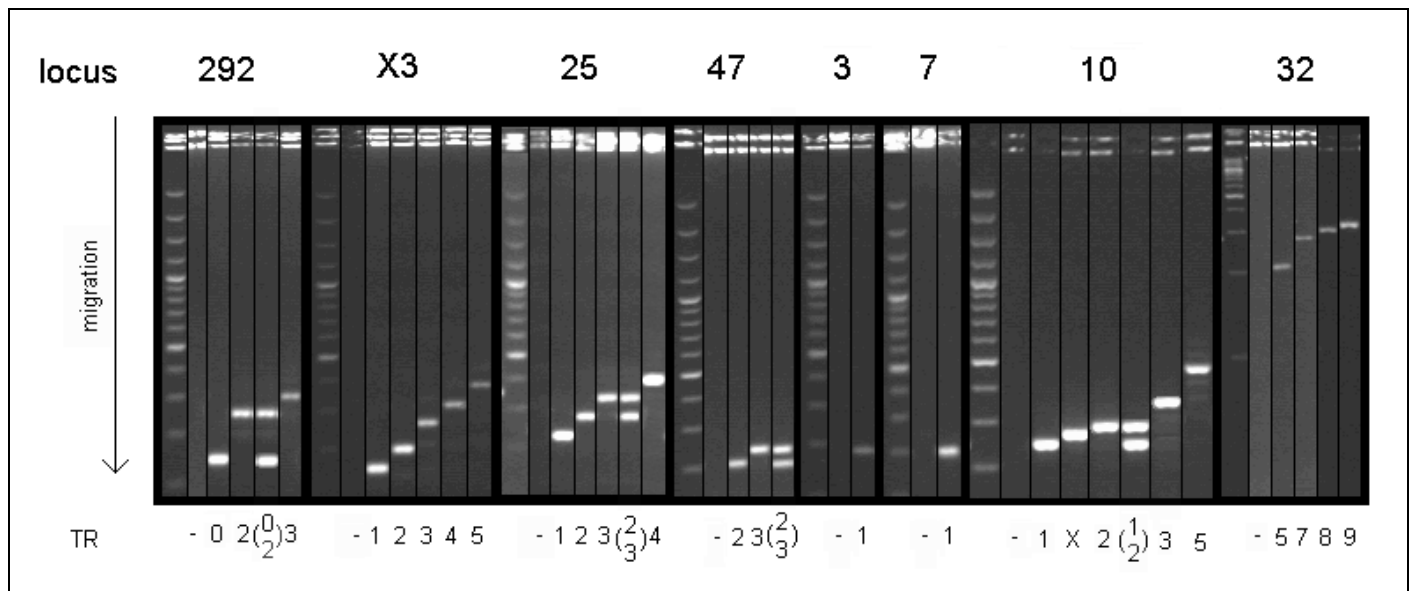


Figure 13 : Typologie des Répétitions en Tandem (TR) obtenues sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 au cours du typage VNTR-MIRUs de *M. avium ssp. avium* ; *M. avium ssp. hominissuis* et *M. avium ssp. silvaticum* selon la méthode développée sur *M. avium ssp. paratuberculosis* (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007)

III.2.b / Combinaison des répétitions en tandem obtenues sur chaque locus

Sur les 168 souches typées par VNTR-MIRUs, 2 souches ne présentent aucun fragment d'amplification sur les 8 loci analysés, une présente ne présente pas d'amplification sur 6 loci analysés. Ces 3 souches particulières seront présent en compte dans le calcul des indices de discrimination, et ne seront pas intégrés aux comparaisons des profils. Sur les 165 souches typables sur la majorité des 8 loci, 53 profils VNTR-MIRUs sont identifiés (Tableau 1).

| VNTR-MIRUs | nombre de souches | VNTR-MIRUs | nombre de souches | VNTR-MIRUs | nombre de souches | VNTR-MIRUs | nombre de souches | VNTR-MIRUs | nombre de souches |
|----------------------|-------------------|--------------|-------------------|------------------|-------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
| ----- | 2 | 05321128 | 10 | 22221129 | 1 | 23331158 | 1 | 25221129 | 2 |
| -1-1-- | 1 | 05331128 | 4 | 22221158 | 2 | 24131117 | 5 | 25221159 | 2 |
| -4221128 | 1 | 11131127 | 1 | 22231118 | 1 | 24131127 | 15 | 25231128 | 1 |
| (0;2)2(2;3)21128 | 1 | 12431158 | 1 | 22231128 | 1 | 24131137 | 1 | 25321128 | 1 |
| (0;2)2331128 | 1 | 15431127 | 1 | 22331128 | 1 | 24221125 | 3 | 25331127 | 1 |
| (0;2)4(2;3)(2;3)1128 | 1 | 21131117 | 2 | 223311-8 | 1 | 24221127 | 1 | 25331128 | 2 |
| (0;2)4(2;3)21128 | 2 | 21131118 | 1 | 23121127 | 1 | 24221128 | 34 | 27221125 | 1 |
| 0143-1X8 | 1 | 22131127 | 4 | 23131127 | 10 | 24231128 | 1 | 32231128 | 2 |
| 02(2;3)(2;3)1128 | 1 | 222(2;3)1128 | 1 | 232(2;3)11(1;2)8 | 1 | 24321128 | 2 | 323311X8 | 1 |
| 03221128 | 1 | 22221127 | 1 | 23221128 | 5 | 25131127 | 1 | 3323-158 | 1 |
| 05221128 | 2 | 22221128 | 18 | 23321128 | 1 | 25221128 | 6 | 35331138 | 1 |

Tableau 1 : Profils VNTR-MIRUs obtenus sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 au cours du typage de *M. avium ssp. avium* ; *M. avium ssp. hominissuis* et *M. avium ssp. silvaticum* selon la méthode développée sur *M. avium ssp. paratuberculosis* (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007)

Par ailleurs, les calculs d'indices de discrimination sur les différents loci étudiés par la méthode de typage VNTR-MIRUs, ont donné des résultats variables (Tableau 2). Dans l'ordre croissant des indices de discrimination (DI), les loci les plus aptes à différencier des souches de *M. avium* spp. sont X3 ; 25 ; 47 ; 32 ; 292 ; 10 ; 3 et 7.

| | | locus | | | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 292 | X3 | 25 | 47 | 3 | 7 | 10 | 32 |
| Répétition en Tandem (TR) | - | 4 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 |
| | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 3 | 6 | 41 | 0 | 164 | 165 | 9 | 0 |
| | 2 | 132 | 38 | 89 | 98 | 0 | 0 | 143 | 0 |
| | 3 | 5 | 21 | 27 | 63 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| | 4 | 0 | 66 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 0 | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 4 |
| | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 44 |
| | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 112 |
| | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | (0;2) | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | (2;3) | 0 | 0 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | (1;2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | X | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| DI | | 0,369 | 0,741 | 0,636 | 0,521 | 0,047 | 0,035 | 0,272 | 0,488 |

Nombre de souches à profil identique (n)

Tableau 2 : Indices de discrimination (DI) des loci 292, X3, loci 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 analysés par typage VNTR-MIRUs de *M. avium* ssp. *avium* ; *M. avium* ssp. *hominissuis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*

Lorsque le DI est calculé sur des combinaisons intégrant des loci de moins en moins discriminant, il est remarquable que les loci 25 ; 47 ; 32 et 10 apportent successivement des pouvoirs de discrimination additionnels de 19,3% ; 2,3% ; 1,9% ; 0,6% et 1,1%, alors que les loci 3 et 7 n'en apportent pas (Figure 14). Au maximum la méthode de typage VNTR-MIRUs atteint un DI de 0,929.

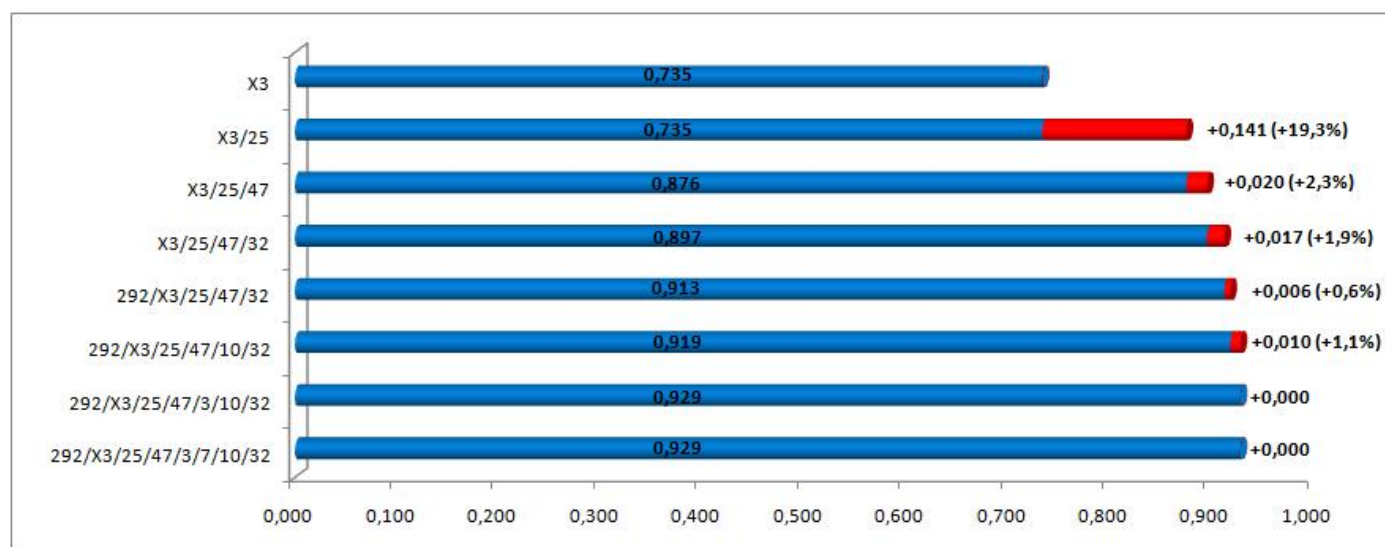


Figure 14 : Pouvoirs de discrimination des combinaisons successives des loci X3 ; 25 ; 47 ; 32 ; 292 ; 10 ; 3 et 7, présentant des indices de discrimination unitaires décroissant respectivement de 0,74 ; 0,64 ; 0,52 ; 0,49 ; 0,37 ; 0,27 ; 0,05 et 0,04 chez *M. avium* ssp. *avium*, ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*

III.2.a / Résultats globaux

Les résultats de typage par VNTR-MIRUs, indiquent une grande diversité, car 53 profils ont été identifiés avec les 165 souches typées (Figure 15, Figure 16 et Figure 17). Par ailleurs, il est à noter que la représentation des distances génétiques comporte 49 profils, car seul est pris en compte les TR le plus grands dans le cas d'un locus diploïde, et les (TR= -) sont considérées comme un TR=0 (Figure 15, Figure 16 et Figure 17). D'autre par, le TR=X du locus 10 compris entre 1 et 2, a été considéré comme un TR=2.

humain, porc, bovin, environnement d'élevage, oiseau, mammifère sauvage ou domestique

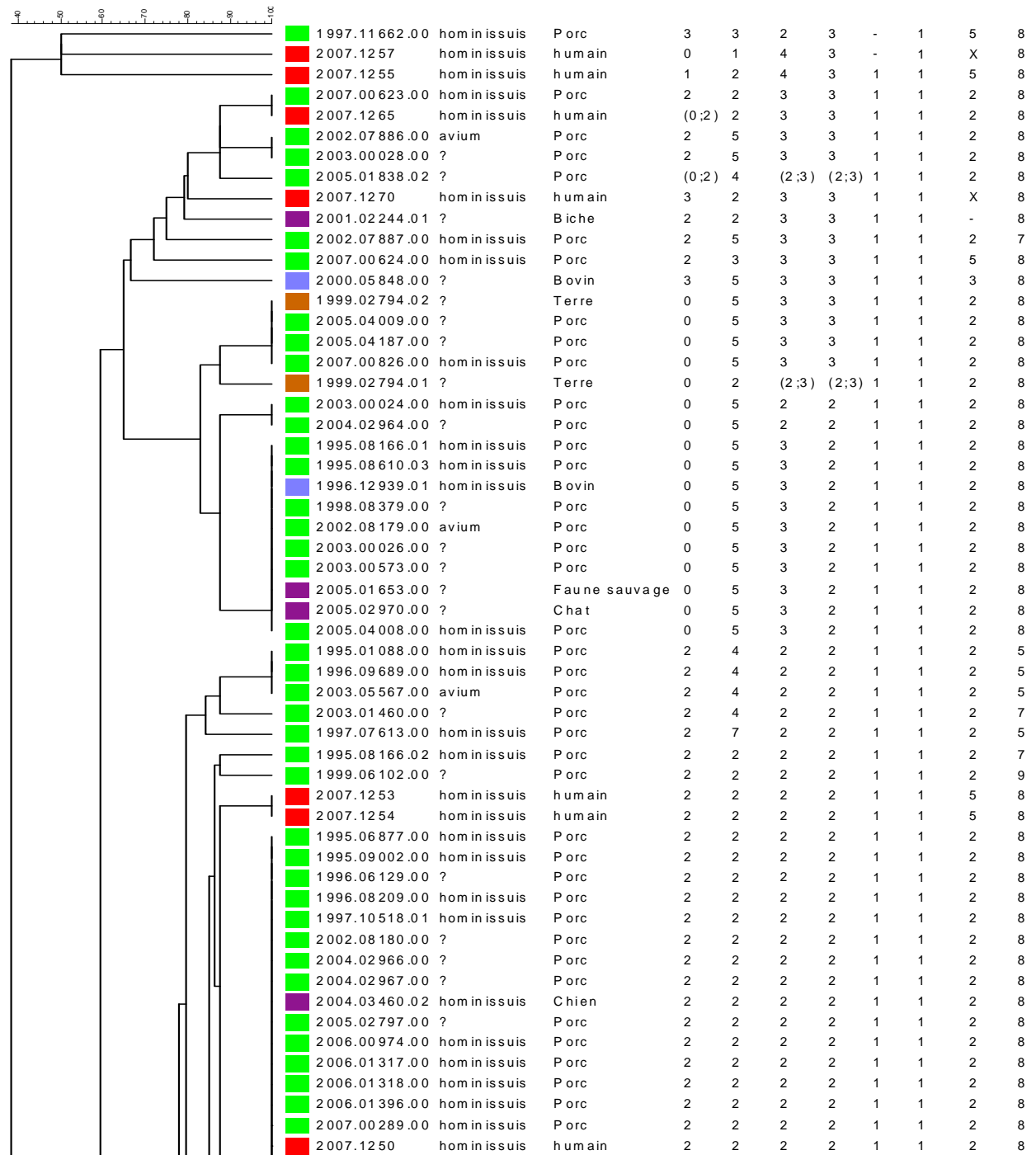


Figure 15 : Première partie du dendrogramme du typage par VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, suivant le coefficient multi-états

humain, porc, bovin, environnement d'élevage, oiseau, faune sauvage et domestique

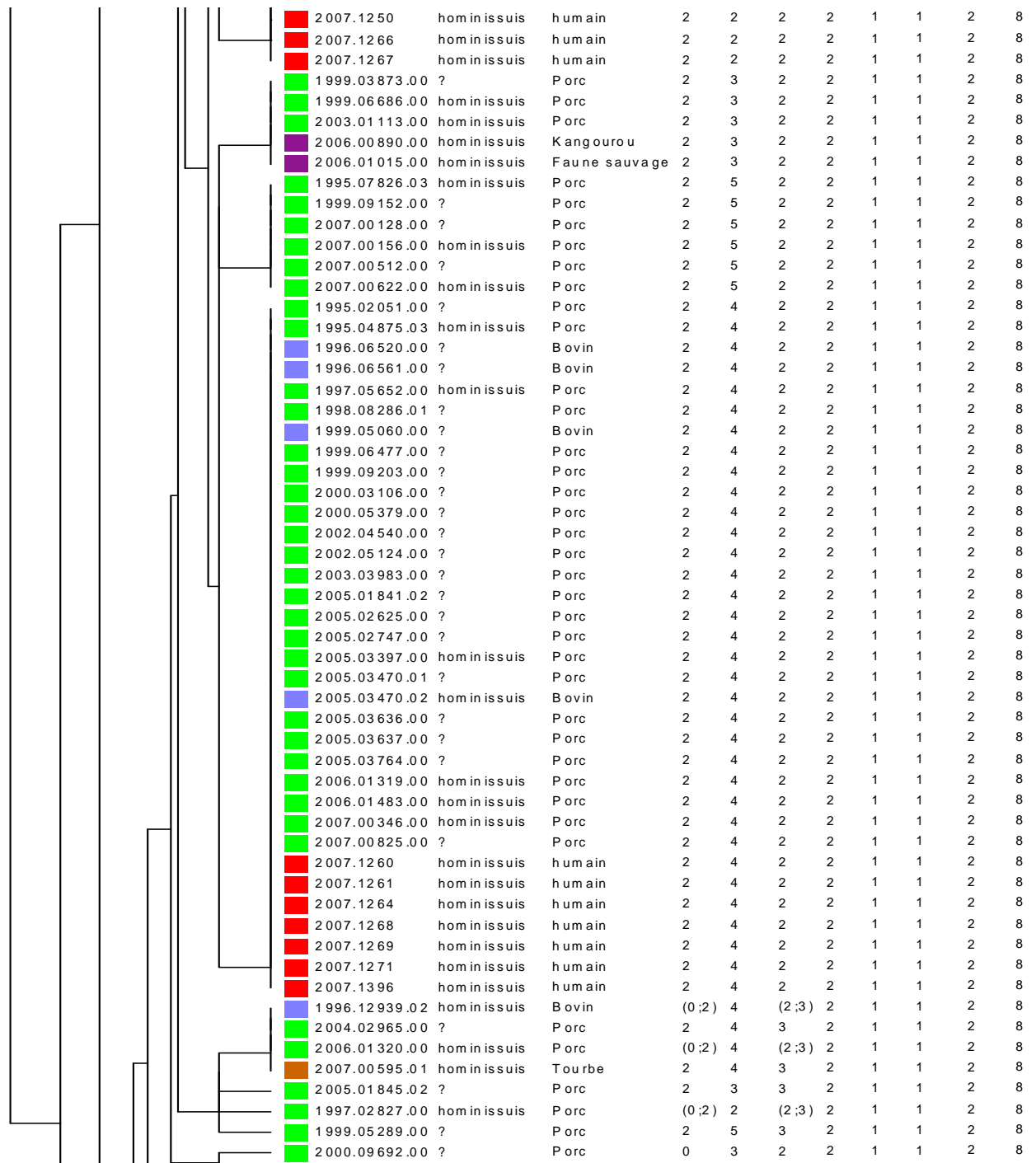


Figure 16 : Deuxième partie du dendrogramme du typage par VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de *M. avium ssp. avium* ; *ssp. hominissuis* et *ssp. silvaticum*, suivant le coefficient multi-états

humain, porc, bovin, environnement d'élevage, oiseau, faune sauvage et domestique

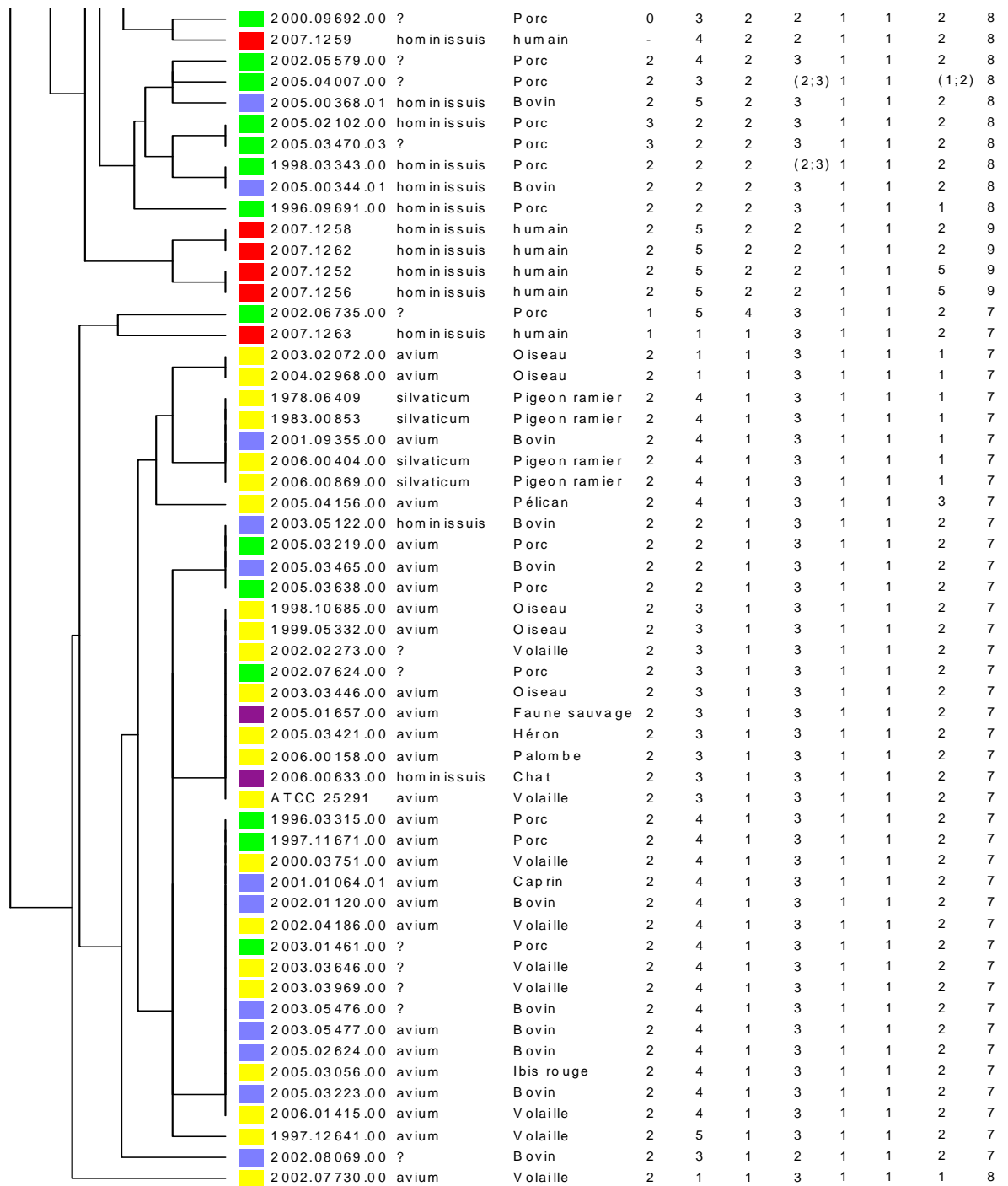


Figure 17 : Troisième partie du dendrogramme du typage par VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, suivant le coefficient multi-états

- Identification

- ▲ **Généralité**

La comparaison des profils VNTR-MIRUs obtenus dans cette étude chez *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, aux profils VNTR-MIRUs obtenus à l'INRA de Tours chez *M. avium* autre que *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, indique la présence de profils identiques et très proches (Tableau 3). Notamment les profils 05321228, (0;2)2331128 et 02(2;3)(2;3)1128 de l'étude présente, qui coïncident avec les profils 05321228, 02331128 et 02331228 obtenus dans l'étude réalisée à l'INRA de Tours. La méthode VNTR-MIRUs développée sur *M. avium* ssp. *paratuberculosis* K10 serait donc reproductible.

| | | | | | | | |
|---|--|------------------|--------------|----------|----------|-------------|----------|
| Résultats de l' Afssa de Maisons-alfort | <i>M. avium</i> autre que <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> | -4221128 | 11131127 | 22221129 | 23221128 | 24231128 | 25331128 |
| | | (0;2)2(2;3)21128 | 12431158 | 22221158 | 23321128 | 24321128 | 27221125 |
| | | (0;2)2331128 | 15431127 | 22231118 | 23331158 | 25131127 | 32231128 |
| | | (0;2)4(2;3)21128 | 21131117 | 22231128 | 24131117 | 25221128 | 27221125 |
| | | 0143-1X8 | 21131118 | 223311-8 | 24131127 | 25221129 | 32231128 |
| | | 02(2;3)(2;3)1128 | 22131127 | 23121127 | 24131137 | 25221159 | 323311X8 |
| | | 03221128 | 222(2;3)1128 | 23121127 | 24221125 | 25231128 | 3323-158 |
| | | 05321128 | 22221127 | 23131127 | 24221127 | 25321128 | 35331138 |
| 05331128 | 22221128 | 231(2;3)11(1;2)8 | 24221128 | 25331127 | | | |
| Résultats de l'INRA de Tours | <i>M. avium</i> autre que <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> | 02331228 | 05531228 | 22231218 | 23221228 | 24321228 | 26221229 |
| | | 02431228 | 15431228 | 22231228 | 24221218 | 25221129 | 32231228 |
| | | 05321228 | 21131228 | 22431218 | 24221225 | 25221227 | 32231228 |
| | | 05521228 | 22221228 | 23131127 | 24221227 | 25221229 | 33231218 |
| | | 05531227 | 22221229 | 23221227 | 24221228 | 26221228 | |
| | <i>paratuberculosis</i> | 21332228 | 32330228 | 32332228 | 32332528 | 3233222(10) | 42332218 |
| | | 22332228 | 32332118 | 32332229 | 32432218 | 32532228 | 42332228 |
| | | 22522228 | 32332128 | 32332328 | 32522228 | 42332128 | 43332228 |
| | | 31332228 | 32332218 | 32332428 | | | |

Tableau 3 : Profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007) chez *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* autre que *M. avium* ssp. *paratuberculosis* par l'INRA de Tours et/ou l' Afssa de Maisons-alfort

- ▲ ***M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis***

De façon générale, les résultats de typage VNTR-MIRUs (Figure 15, Figure 16 et Figure 17) indiquent que sur les 70 souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-), 68 sont regroupées au sein d'un grand ensemble dépourvu de souches d'origine aviaire (123 souches de 1997.11662.00 à 2007.1256), mais présentant 3 souches attribuées par amplification PCR de IS901 à *M. avium* ssp. *avium* (IS901+ : 2003.05567.00, 2002.08179.00, 2002.07886.00). Ces 70 *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-) ont été isolées de l'homme, du porc, du bovin des mammifères sauvages et domestiques, et de l'environnement d'élevage. Par opposition, les résultats de typage VNTR-MIRUs (Figure 17) indiquent que sur les 30 souches de *M. avium* ssp. *avium* (IS901+), 27 sont regroupées au sein d'un grand ensemble représenté par des souches isolées d'oiseaux et d'animaux comme le bovin, le porc et les mammifères sauvages et domestiques (42

souches de 2002.06735.00 à 2002.07730.00). En conséquence, des profils VNTR-MIRUs seraient en général associés à *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-) isolé de mammifères, et des profils VNTR-MIRUs seraient généralement associés à *M. avium* ssp. *avium* (IS901+) isolé d'oiseaux, mais aussi de mammifères, l'homme mis à part. Néanmoins, certains profils VNTR-MIRUs, comme 05321128 ; 22131127 ; 23131127 et 24221125, sont attribués à la fois à des souches présentant des amplifications PCR forte de IS901, ou présentant une amplification nulle de IS901 (Figure 18). Ces exceptions indiqueraient que l'identification par amplification PCR de IS901 n'est pas totalement spécifique, car les profils VNTR-MIRUs 05321128 et 24221125 sont généralement attribués à la sous-espèce *hominissuis*, et les profils 22131127 et 23131127 sont généralement attribués à la sous-espèce *avium* (Figure 15, Figure 16 et Figure 17). A contrario, le typage VNTR-MIRUs peut donc différencier les sous-espèces *hominissuis* et *avium*.

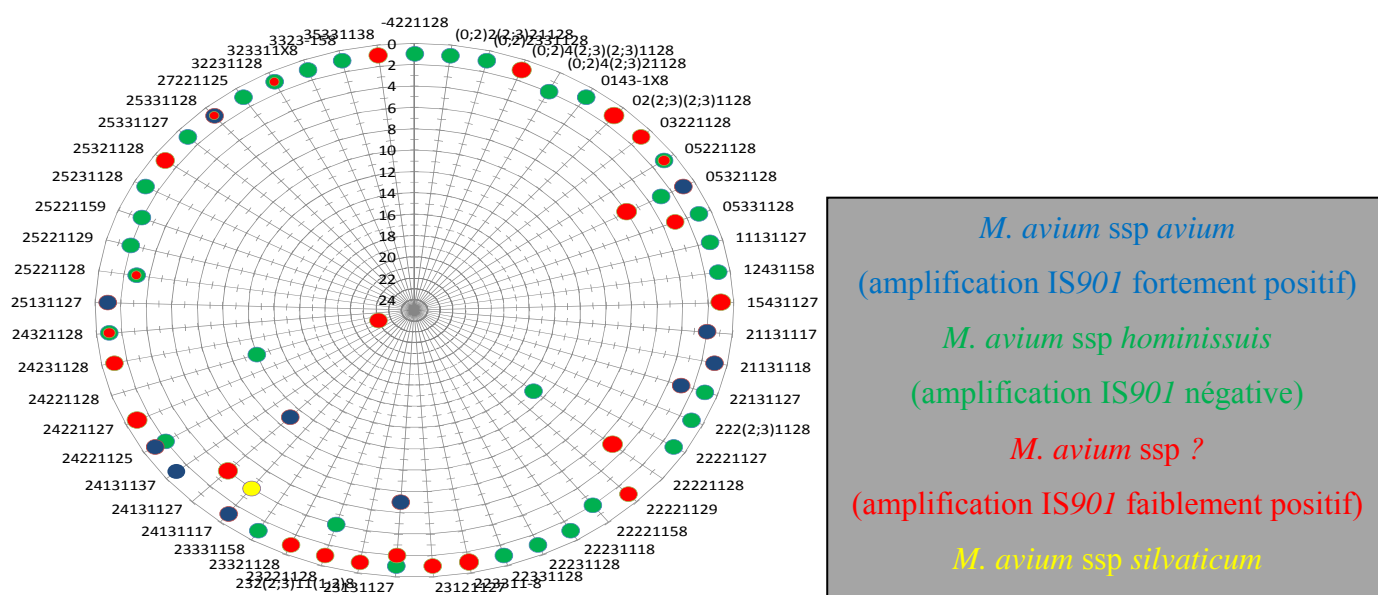


Figure 18 : Répartition du nombre de souches associées par profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007), en fonction de sous-espèces de *M. avium* identifiées par amplification PCR de IS901

Par ailleurs (Figure 15, Figure 16 et Figure 17), il est remarquable que le locus 25 présente toujours une répétition en tandem pour le groupe de profils attribués à *M. avium* ssp. *avium* (de 2003.02072.00 à 2002.07730.00), alors qu'il présente de 2, 3 ou 4 répétitions pour le groupe de profils attribués à *M. avium* ssp. *hominissuis* (de 1997.11662.00 à 2002.06735.00). En vue des ambiguïtés de la méthode d'identification par amplification PCR de IS901 qui n'apparaît pas comme totalement spécifique, ce locus 25 pourrait donc avoir un intérêt pour différencier la sous-espèce *avium* et *hominissuis*. Par ailleurs, à de rares exceptions il est à noter que le locus 32 présente généralement 7 répétitions pour les souches attribuées à la sous-espèce *avium* (de 2003.02072.00 à 2002.07730.00), et 8 répétitions pour les souches attribuées à la sous-espèce *hominissuis* (de 1997.11662.00 à 2002.06735.00). Néanmoins, ces exceptions ne permettent pas d'utiliser ce locus dans un objectif d'identification.

▲ *M. avium* ssp. *silvaticum*

Les résultats du typage VNTR-MIRUs indiquent que les quatre souches de *M. avium* ssp. *silvaticum* présentent le profil 24131117, qui a aussi été observé pour une souche isolée du bovin (2001.09355.00) attribuée à *M. avium* ssp. *avium* (IS901+). Ceci pose problème pour identifier cette sous-espèce par VNTR-MIRUs (Figure 18), à moins que la souche 2001.09355.00 soit de la sous-espèce *silvaticum* sans pour autant nécessiter de mycobactine pour se développer. Des investigations supplémentaires sont donc à envisager.

▲ *Sous-espèce de M. avium non identifiée par amplification de IS901*

D'après la répartition du nombre de souches associées aux profils VNTR-MIRUs en fonction de l'identification par amplification PCR de IS901 (Figure 18), il est remarquable que les souches présentant une amplification faible de cet élément d'insertion, ont des profils VNTR-MIRUs uniques par rapport aux autres sous-espèces, ou associées à des souches identifiées comme appartenant à la sous-espèce *avium* (24131127 ; 25331128), à la sous-espèce *hominissuis* (05221128 ; 05331128 ; 22221128 ; 23221128 ; 24221128 ; 24321120 ; 25221128), ou aux deux à la fois (05321128 ; 23131127). En effet, ces souches présentant une faible amplification PCR de IS901 (Figure 15, Figure 16 et Figure 17), sont intégrées à l'un ou l'autre des ensembles de profils VNTR-MIRUs associés généralement à la sous-espèce *hominissuis* (de 1997.11662.00 à 2007.1256) ou *avium* (de 2002.06735.00 à 2002.07730.00). Ces résultats soulignent encore les limites de l'identification de la sous-espèce *avium* et *hominissuis* par amplification PCR de IS901.

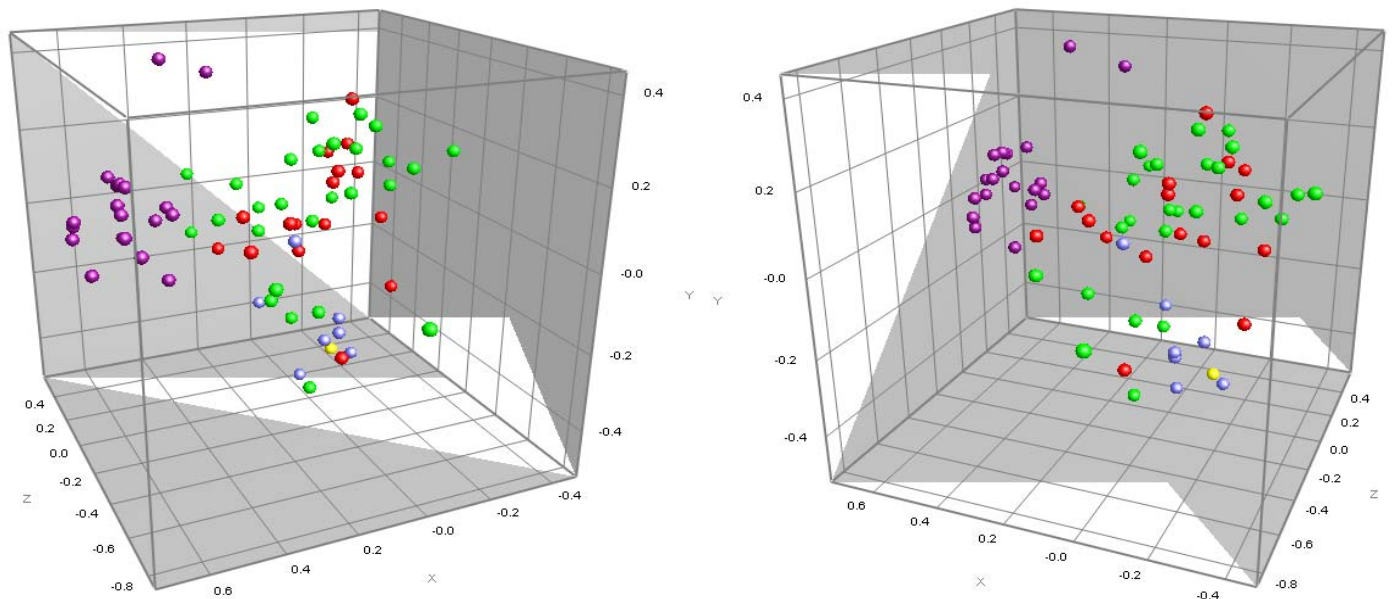
▲ *M. avium* ssp. *paratuberculosis*

La comparaison des profils VNTR-MIRUs obtenus dans l'étude présente chez *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, aux profils VNTR-MIRUs obtenus à l'INRA de Tours chez *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, indique qu'aucun profil identifié n'est identique (Tableau 3). De plus, cette étude de l'INRA de Tours n'a pas de profils VNTR-MIRUs commun entre *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* autre que *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (Tableau 3). En conséquence, le typage VNTR-MIRUs est probablement capable de différencier *M. avium* ssp. *paratuberculosis* des autres sous-espèces du MAC comme *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* ; ssp. *silvaticum*.

Plus précisément, mis à part les répétitions en tandem nulles (TR=0 ou -), il est remarquable que le locus 3 présente toujours 2 répétitions en tandem chez *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, alors que *M. avium* autre que *M. avium* ssp. *paratuberculosis* n'en présente qu'une, ce qui pourrait être utilisé pour identifier la sous-espèce *paratuberculosis* des sous-espèces *avium*, *hominissuis* et *silvaticum* (Tableau 3).

De façon générale, la comparaison des profils VNTR-MIRUs identifiés par l'INRA de Tours chez *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, aux profils VNTR-MIRUs identifiés dans la présente étude (Figure 19 : nuage de point violet distinct des nuages de points rouge, vert, bleu et jaune), indique clairement des séparations taxonomiques entre les quatre sous-espèces de *M. avium*. Effectivement, la majorité des profils attribués à *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, et *M. avium* ssp. *silvaticum* sont distincts. Par ailleurs, il est à noter que le profil VNTR-MIRUs attribué à

quatre souches de *M. avium* ssp. *silvaticum* isolées du pigeon, est très proche des profils d'origine aviaire attribués à *M. avium* ssp. *avium* (Figure 19 : nuage de point bleu et point jaune), ce qui soulignerait l'origine taxonomique étroite de ces deux sous-espèces. D'autre part, les profils des souches présentant une faible amplification de IS901, sont beaucoup plus proches des profils attribués à *M. avium* ssp. *hominissuis*, que des profils attribuer à *M. avium* ssp. *avium* (Figure 19 : nuage de point rouge beaucoup plus confondu avec le nuage de point vert, qu'avec le nuage de point bleu), ce permettrait d'émettre l'hypothèse selon laquelle *M. avium* ssp. *hominissuis* peut présenter dans son génome des faibles copies de IS901, et donc se rapprocher phylogénétiquement de la sous-espèce *avium*.



M. avium ssp *avium* (amplification IS901 fortement positif), *M. avium* ssp *hominissuis* (amplification IS901 négative), *M. avium* ssp ? (amplification IS901 faiblement positif), *M. avium* ssp *silvaticum*,
M. avium ssp. *paratuberculosis*

Figure 19 : Représentation en trois dimensions des distances génétiques existantes entre les profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007) chez *M. avium* ssp *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis* , *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*

- Epidémiologie

- ▲ **Contamination des mammifères comme l'homme, le porc et les animaux sauvages et domestiques**

Un profil VNTR-MIRUs associé à *M. avium* ssp. *hominissuis* (22221128) est identique entre 3 souches d'origine humaine et 14 souches d'origine porcine (Figure 20), ce qui renforce l'hypothèse de transmission, ou de source commune d'infection entre ces deux mammifères. Par ailleurs ce profil VNTR-MIRUs 22221128, est aussi rencontré chez des mammifères sauvages et domestiques, et le profil 24221128, aussi associé à *M. avium* ssp. *hominissuis*, est rencontré pour 7 souches d'origine humaine ; 3 souches d'origine bovine et 24 souches d'origine porcine (Figure 20). Une source d'infection commune ou une transmission de *M. avium* ssp. *hominissuis*, sont donc possibles entre l'homme, le porc, le bovin et les mammifères sauvages.

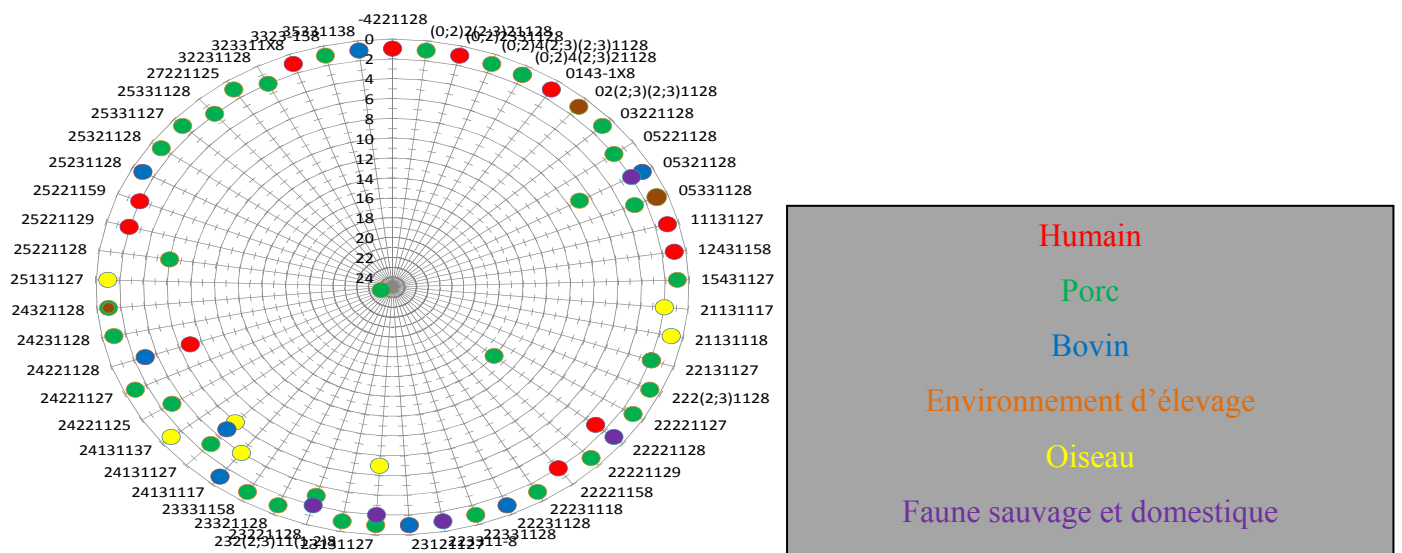


Figure 20 : Répartition du nombre de souches associées par profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007), en fonction de l'origine

En ce qui concerne les profils génétiques spécifiques de l'hôte, il est remarquable que les profils VNTR-MIRUs 24221128 et 22221128 sont les deux profils (Figure 20) majoritaires à la fois chez l'homme, respectivement 7 et 3 souches, et chez le porc, respectivement 24 et 14 souches. Ces deux profils seraient donc particulièrement associés à l'homme et au porc.

▲ *Contamination du porc via l'environnement*

Les résultats de typage VNTR-MIRUs suggèrent une transmission probable de *M. avium* ssp. *hominissuis* au porc via l'environnement. Effectivement, les profils VNTR-MIRUs 24321128 et 05331128, qui sont associés à *M. avium* ssp. *hominissuis*, sont rencontrés pour des souches isolées du porc et de l'environnement d'élevage (Figure 20).

▲ *Contamination de l'environnement et des mammifères par les oiseaux*

Il est à noter que les profils 24131127 et 23131127, qui sont associés à *M. avium* ssp. *avium*, sont associés à des souches d'origine aviaire (respectivement 6 et 7 souches), mais aussi à des souches isolées de mammifères, respectivement 3 souches de porc, 5 souches de bovin, et une souche de porc, 2 souches de mammifères sauvage ou domestique (Figure 20). Ces résultats de typage VNTR-MIRUs suggèrent que *M. avium* ssp. *avium*, provenant des oiseaux, peut infecter les mammifères comme le porc, le bovin et les animaux sauvages et domestiques.

▲ *Cas particulier de la contamination du pigeon ramier*

Le typage VNTR-MIRUs attribue le profil 24131117 aux 4 souches de *M. avium* ssp. *silvaticum*, mais aussi à une souche de *M. avium* ssp. *avium* isolée d'un bovin (2001.09355.00). Néanmoins, cela ne peut pas faire suggérer une relation épidémiologique, car cette souche de *M. avium* ssp. *avium* n'est pas mycobactine dépendante et présente, comme nous allons le voir par la suite (§ III.3.c /), un profil RFLP1311 distinct (deux bandes éloignées) de celui attribué à *M. avium* ssp. *silvaticum* (deux bandes proches). En revanche ce profil VNTR-MIRUs commun souligne le lieu taxonomique étroit entre ces deux sous-espèces aviaires.

III.3 / Typages RFLP

III.3.a / Suivi du typage par RFLP1311-1245

- Normalisation de la concentration en ADN

Avant normalisation de la concentration en ADN génomique et après la restriction enzymatique, l'observation des extraits d'ADN et des produits de restriction, a permis de repérer les souches avec un génome dégradé. Ces dernières n'ont donc pas été retenues pour les résultats finaux (Figure 21).

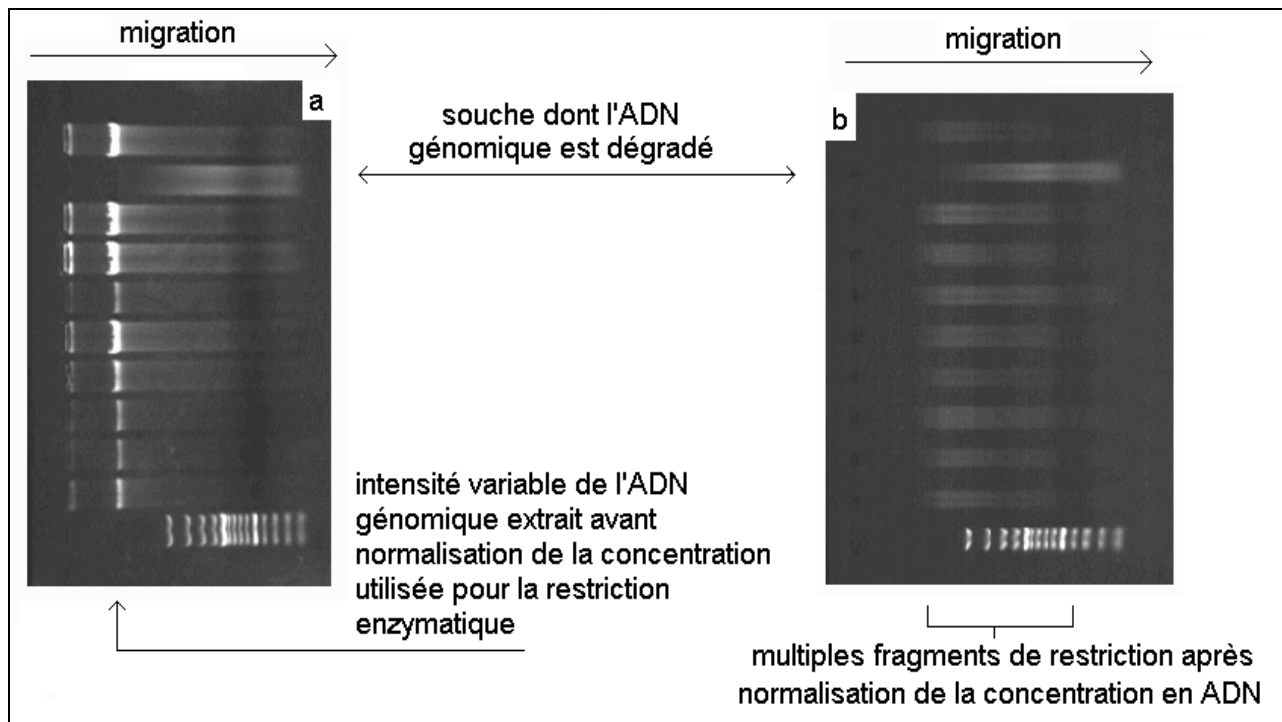


Figure 21 : Observation de l'ADN génomique extrait avant normalisation de la concentration (a) et après la restriction enzymatique (b)

Par ailleurs, la normalisation de la migration des fragments de restriction à une distance de 14,5cm entre les puits de dépôt et le fragment de 1kb du marquer de taille (Figure 22), a permis de visualiser des souches présentant une concentration faible ou forte, et donc pouvant expliquer le degré d'intensité du signal à la détection des sondes hybridées. Les souches présentant une quantité d'ADN faible n'ont donc pas été retenues pour les résultats finaux.

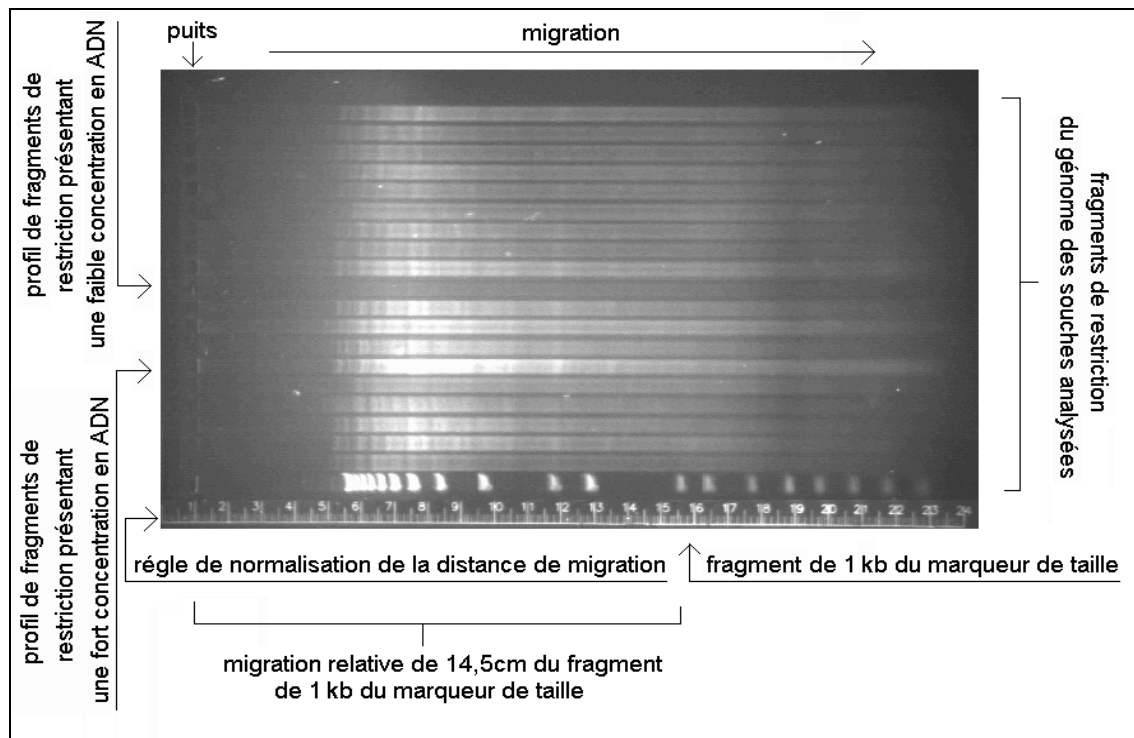


Figure 22 : Migration des fragments de restriction à une distance normalisée de 14,5cm entre les puits et le fragment à 1kb du marqueur de taille, permettant une comparaison inter-gels de profils RFLP1245-1311

De plus, la règle décimale des plateaux de gel et le marqueur de taille de 1kb a permis de reporter la migration relative des fragments de 7kb ; 5kb ; 4kb ; 3kb ; 2kb ; 1,5kb et 1kb en parallèle des profils RFLP obtenus après détection de la chimioluminescence, dans l'objectif de les utiliser pour l'analyse des distances génétiques en corrélation avec le marqueur de taille interne de BIONUMERICS.

Du fait des extractions d'ADN faibles et des génomes dégradés, sur les 168 souches de l'étude il a été possible de typer 127 souches par RFLP1311. Néanmoins en parallèle de ces extractions d'ADN faibles et de ces génomes dégradés, un problème analytique au niveau de l'hybridation n'a permis que de typer par RFLP1245 seulement 51 souches sur les 168 étudiées.

III.3.b / Typage RFLP1245

• Résultats globaux

Les résultats de typage par RFLP1245, indiquent une grande diversité des 51 souches analysées, car seulement 4 groupes intègrent des souches de profils identiques et 43 souches ont un profil unique (Figure 23). Les 4 groupes de profils identiques sont pour chacun constitués de deux souches. Cette diversité représente un DI de 0,997.

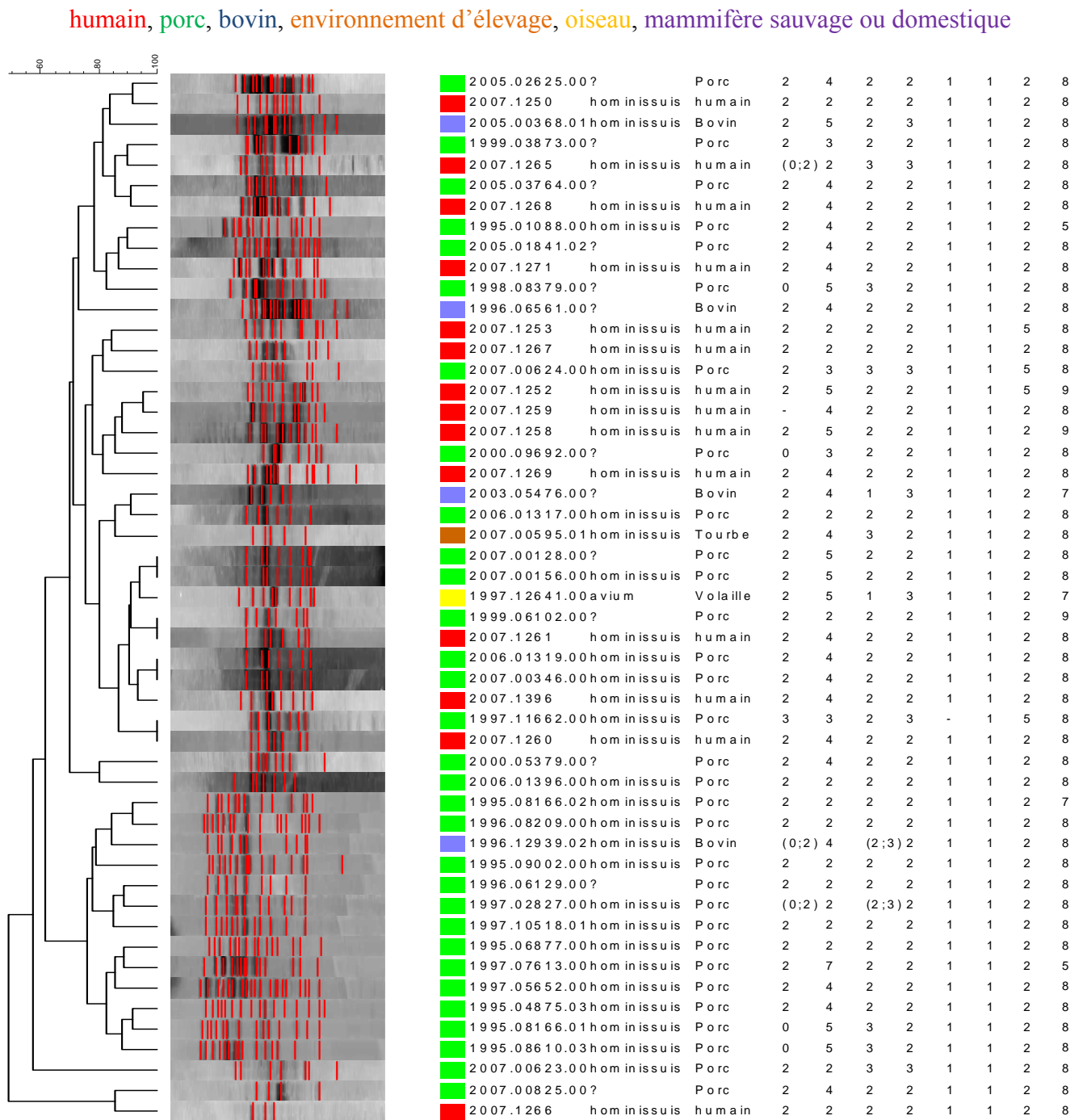


Figure 23 : Dendrogramme du typage par RFLP1245 de *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, suivant le coefficient de Dince à 2% d'optimisation et 2% de tolérance, et résultats du typage VNTR-MIRUs sur les loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32

- Identification

- ▲ ***M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis***

Les résultats de l'étude présente (Figure 23), indiquent que sur 37 souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-) typées par RFLP1245, toutes présentent une signature multi-bandes. Ces dernières sont issues de l'homme, du porc, du bovin, et de l'environnement d'élevage (tourbe). Ces résultats sont partiellement en accord avec l'étude qui a proposé la désignation des sous-espèces *avium* et *hominissuis*. Celle-ci s'est basée sur l'observation que les profils RFLP1245 de souches d'origine aviaire présentaient 3 bandes, et que les profils RFLP1245 de souches d'origine porcine présentaient une multitude de bandes (Mijs *et al.* 2002).

Néanmoins, la seule souche de *M. avium* ssp. *avium* isolée de volaille et typée par RFLP1245 (1997.12641.00), présente une signature multi-bandes (Figure 23). Ceci est en désaccord avec les études sur les cas de tuberculose aviaire dans les abattoirs de porc de République Tchèque (Matlova *et al.* 2005) et des Pays Bas (Komijn *et al.* 1999), qui indiquent que les signatures multi-bandes sont généralement attribuées à la sous-espèce *hominissuis* (IS901-) isolée du porc, et que le profil RFLP1245 à 3 bandes est généralement associé aux souches de *M. avium* ssp. *avium* d'origine aviaire (IS901+). Néanmoins, les études Finlandaise (Johansen *et al.* 2007), et Allemande portant sur *M. avium* chez le porc, ont observé des profils à quelques bandes (Johansen *et al.* 2007) et des profils multi-bandes chez *M. avium* ssp. *avium* (Johansen *et al.* 2007; Möbius *et al.* 2006). L'étude sur les bovins en République Tchèque (Matlova *et al.* 2004), observe aussi que *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-) et *M. avium* ssp. *avium* (IS901+) ont respectivement en général des profils RFLP1245 multi-bandes et à 3 bandes, mais que *M. avium* ssp. *avium* (IS901+) pouvait présenter des profils RFLP1245 multi-bandes. Hormis cette souche de *M. avium* ssp. *avium* isolée de volaille et ne présentant le profil RFLP1245 commun aux souches d'origine aviaire (3 bandes), il est troublant de ne pas avoir détecté d'autres *M. avium* ssp. *avium* pouvant présenter un profil RFLP1245 à 3 bandes (Figure 5). Effectivement, il a été possible de typer par RFLP1245, 37 souches de la sous-espèce *hominissuis* sur les 69 identifiées par amplification PCR de IS901, et 1 souches de la sous-espèce *avium* sur les 36 identifiées par amplification PCR de IS901. La différence entre ces deux proportions pourrait être expliquée du fait l'hybridation de IS1245 serait moins aisée sur des génomes d'origine aviaire, qu'elle ne l'est sur des génomes de mammifères. Pour faciliter cette hybridation, il serait intéressant d'utiliser plus de 1µg d'ADN/puits à l'étape de migration de la méthode RFLP1245.

- ▲ ***M. avium* ssp. *silvaticum***

Les problèmes au cours du typage RFLP1245, et en particulier d'hybridation au génome de la sonde marquée, n'ont pas permis de caractériser les souches de *M. avium* ssp. *silvaticum* sélectionnées pour l'étude.

▲ *Souche de M. avium non identifiée par amplification de IS901*

En ce qui concerne les souches *M. avium* ssp. ? (IS901 faible) typées par RFLP1245, il est remarquable que celles-ci ont toutes un profil multi-bandes, et sont toutes isolées du porc ou du bovin (Figure 23). De plus, certaines d'entre elles ont des profils similaires à 90-100% avec des souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* (1999.06102.00≈ 2007.1261, 2005.03764.00≈ 2007.1268 et 2005.02625.00≈ 2003.05122.00).

En conclusion, les résultats du typage par RFLP1245 n'ont pas permis d'apprécier les différences pouvant démontrer la séparation phylogénétique de *M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis*. Néanmoins, il est apparu par le typage RFLP1245, que les souches présentant une amplification de IS901 faibles, sont similaires à des souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-) et qu'elles étaient aussi isolées du porc et du bovin. Ainsi, la différenciation des sous-espèces *avium* et *hominissuis* en fonction de la présence ou de l'absence de IS901, ne semble pas être d'une exactitude aussi binaire.

• Epidémiologie

▲ *Généralité*

Les résultats de RFLP1245 indiquent une grande diversité des souches typées. D'une part, des souches différenciées par RFLP1245 présentent un profil VNTR-MIRUs identique (ex : 2005.03764.00 et 2007.1268), et d'autre part des profils RFLP1245 identiques présentent des profils VNTR-MIRUs différents (ex : 1999.06102.00 et 2007.1261). En conséquence la combinaison de la méthode RFLP1245 à la méthode VNTR-MIRUs aurait un intérêt épidémiologique.

▲ *Contamination de l'homme et du porc*

Dans la présente étude, des profils RFLP1245 de *M. avium* ssp. *hominissuis*, d'origine humaine et porcine (Figure 23) présentent des similitudes à 90-100% (1999.06102.00≈ 2007.1261 et 1997.11662.00≈ 2007.1260), mais sans pour autant que leurs profils VNTR-MIRUs soient les mêmes. D'autre part, il est remarquable que des profils RFLP1245 de *M. avium* ssp. *hominissuis*, d'origine humaine et porcine, présentent des similitudes à 90%, tout en ayant des profils VNTR-MIRUs identiques (2006.01319.00≈ 2007.00346.00≈ 2007.1396). Ceci est observable en particulier pour le profil VNTR-MIRUs 24221128. L'observation de ces profils RFLP1245 similaires est en accord avec des études de comparaison par RFLP1245 de *M. avium* isolées de l'homme et du porc au Danemark (Bauer *et al.* 1999), au Pays Bas (Komijn *et al.* 1999) et en Finlande (Tirkkonen *et al.* 2007). Du fait des fortes similitudes observées entre ces souches de *M. avium*, ces études suggèrent une probable transmission du porc à l'homme, et en particulier une transmission de *M. avium* ssp. *hominissuis*.

Par analogie à ces observations (Figure 23), d'une part un profil RFLP1245 de *M. avium* ssp. *hominissuis* d'origine humaine est similaire à 90% avec un profil de *M. avium* ssp. ? d'origine porcine (1999.03873≈ 2007.1265), tout en ayant des profils VNTR-MIRUs différents, et d'autre part un profil RFLP1245 de *M. avium* ssp. *hominissuis* d'origine humaine et similaire à 90% avec un profil de

M. avium ssp. ? d'origine porcine (2005.03764.00≈ 2007.1268), tout en ayant des profils VNTR-MIRUs identiques. Là encore, il s'agit du profil VNTR-MIRUs 24221128.

▲ **Contamination de l'homme et du bovin**

De plus comme le porc, deux profils RFLP1245 de *M. avium* ssp. *hominissuis* d'origine humaine et bovine (2005.00368.01≈ 2007.1250) présentent des similitudes à 85% (Figure 23). Cette observation est en accord avec l'étude comparative des méthodes RFLP1245 et PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) appliquées à *M. avium*, qui a observé des profils RFLP1245 semblables à 80% entre le porc et l'homme, ainsi qu'entre le bovin et l'homme (Möbius *et al.* 2006). Des transmissions du germe peuvent donc avoir lieu entre l'homme et le bovin, ou ces deux mammifères sont contaminés par une source commune de *M. avium* ssp. *hominissuis*. Néanmoins le risque de transmission à l'homme à partir du bovin est plus faible que le risque de transmission à l'homme à partir du porc, car contrairement à ce dernier, il n'est pas observé chez le bovin de lésions organiques.

▲ **Contamination du porc et du bovin via l'environnement**

Il est à noter par ailleurs que deux souches de *M. avium* ssp. *hominissuis*, l'une d'origine porcine (2007.00595.01) et l'autre issue de tourbe (2006.01317.00), présentent des profils RFLP1245 similaires à 85% (Figure 23). Cela suggère une contamination du porc probable par la tourbe utilisée comme complément alimentaire. Ceci est en accord avec l'étude Danoise (Bauer *et al.* 1999) et l'étude en République Tchèque (Matlova *et al.* 2005), qui ont observé des profils RFLP1245 identiques entre des souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* isolées du porc et de la tourbe. Néanmoins, la contamination du porc par la tourbe est difficilement envisageable en France, car l'utilisation de ce complément alimentaire y est interdite pour le porc.

Toujours par analogie avec ces observations et indépendamment des profils VNTR-MIRUs, des souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* et de *M. avium* ssp. ?, isolées de porc et de bovin, ont des profils RFLP1245 semblables à 90-100% (2006.01317.00≈ 2003.05476.00 et 2005.02625.00≈ 2003.05122.00). Si les souches présentant des amplifications IS901 faibles sont de la sous-espèce *hominissuis*, ceci renforcerait l'hypothèse de transmission ou de source de contamination commune entre le porc et le bovin.

▲ **Contamination de l'homme, du porc et du bovin et relation avec l'environnement**

Les profils RFLP1245 permettent de suggérer une transmission de *M. avium* ssp. *hominissuis* entre l'homme et les animaux d'élevage comme le porc et le bovin, ou l'existence d'un réservoir de contamination commun. La tourbe semble aussi être une source alimentaire d'infection du porc par *M. avium* ssp. *hominissuis*. Par ailleurs les fortes similitudes observées entre *M. avium* ssp. *hominissuis* et *M. avium* ssp. ? chez le porc, le bovin et l'homme, sont en désaccord avec l'utilisation de l'amplification de IS901 pour différencier la sous-espèce *avium* et *hominissuis*. Effectivement, les résultats du typage RFLP1245 indiquent d'étroites relations entre des souches présentant une faible amplification de IS901, et des souches ne présentant aucune amplification de IS901.

III.3.c / Typage RFLP1311

Les résultats de typage par RFLP1311, indiquent une grande diversité des 127 souches typées, car seulement 9 groupes intègrent des souches de profils identiques et 68 souches ont un profil unique (Figure 24 et Figure 25). Les 59 souches réparties dans 9 groupes de profils identiques, sont respectivement dans des groupes à 2, 5, 2, 4, 2, 6, 2, 4 et 32 souches (profils à deux fragments éloignés considérés comme identiques). Cette diversité représente un DI de 0,933.

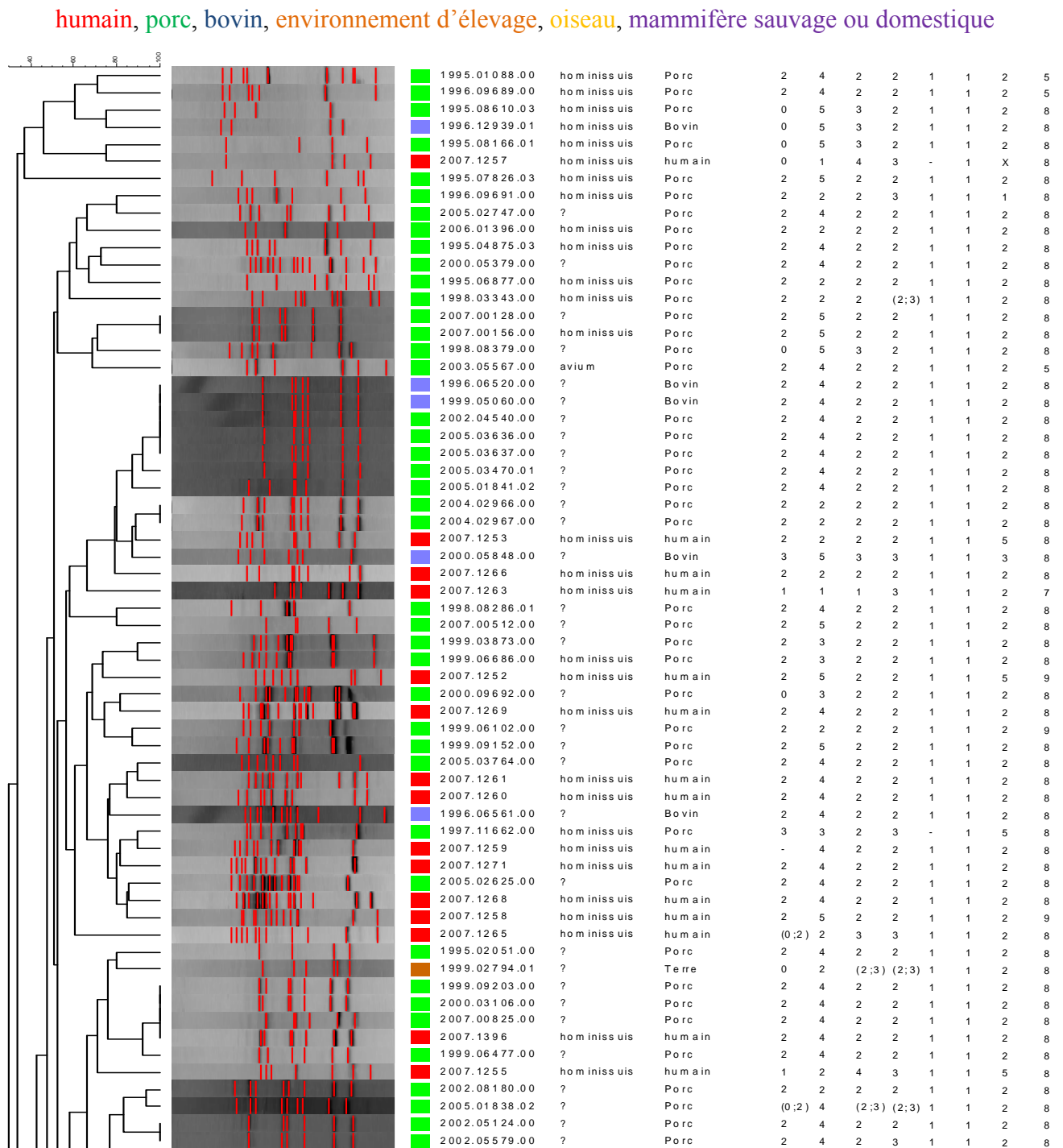


Figure 24 : Première partie du dendrogramme du typage par RFLP1311 de *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, suivant le coefficient de Dince à 2% d'optimisation et 2% de tolérance , et résultats du typage VNTR-MIRUs sur les loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32

humain, porc, bovin, environnement d'élevage, oiseau, mammifère sauvage ou domestique

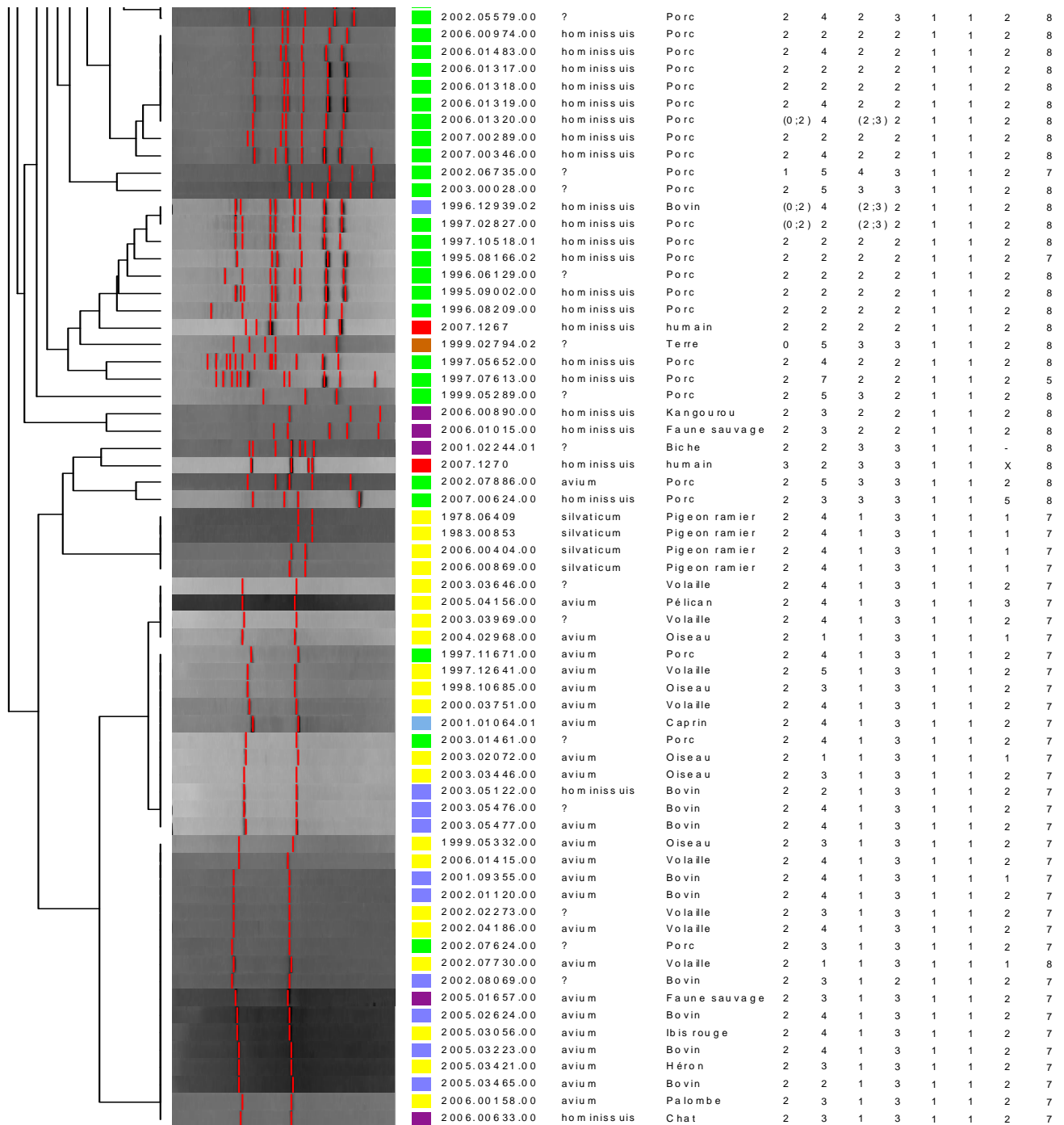


Figure 25 : Deuxième partie du dendrogramme du typage par RFLP1311 de *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, suivant le coefficient de Dince à 2% d'optimisation et 2% de tolérance, et résultats du typage VNTR-MIRUs sur les loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32

- Identification

- ▲ ***M. avium* ssp. *avium* et *M. avium* ssp. *hominissuis***

Les résultats de l'étude présente (Figure 24 et Figure 25), indiquent que sur 52 souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-) typées par RFLP1311, 50 présentent une signature multi-bandes et 2 présentent une signature à deux bandes. Ces *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-) sont issues de l'homme, du porc, du bovin, de l'environnement d'élevage (tourbe), et de mammifères sauvages (kangourou et autres) et domestique (chat). D'autre part sur 25 souches de *M. avium* ssp. *avium* (IS901+) typées par RFLP1311, 23 présentent une signature à deux bandes éloignées et 2 présentent une signature multi-bandes. Ces *M. avium* ssp. *avium* (IS901+) sont issues du porc, du bovin, de caprin, de la faune sauvage, mais majoritairement d'oiseaux (14 souches isolées de volaille et d'oiseau). En conséquence, la majorité des souches présentant un profil multi-bandes par RFLP1311, sont issues du porc et de l'homme, et ont été identifiées par PCR comme *M. avium* ssp. *hominissuis* (IS901-), alors que la majorité des souches présentant un profil à deux bandes éloignées par RFLP1311, sont issues d'oiseaux et ont été identifiées par PCR comme *M. avium* ssp. *avium* (IS901+). Le fait d'attribuer le profil RFLP1311 à deux bandes éloignées, à *M. avium* ssp. *avium* isolé d'oiseaux, est d'ailleurs en accord avec une étude Finlandaise (Johansen *et al.* 2005), qui a aussi attribué les profils RFLP1311 multi-bandes à des mammifères comme l'homme et le porc. Par ailleurs, une autre étude Finlandaise (Johansen *et al.* 2007) a attribué les profils RFLP1311 multi-bandes à *M. avium* isolé du porc et de l'homme, tout en observant cela dans de rares cas chez *M. avium* isolé d'oiseaux (IS901+). Ceci pourrait être expliqué par le fait que *M. avium* ssp. *hominissuis* contamine les mammifères d'élevage ainsi que leur environnement, et dans de rares cas les oiseaux qui seraient contaminés par l'environnement, par exemple lorsque ces derniers iraient se nourrir à proximité des élevages contaminés. Si tel est le cas l'attribution de la sous-espèce *avium* à ces souches présentant un profil RFLP1311 à plusieurs fragments, est erronée.

- ▲ ***M. avium* ssp. *silvaticum***

Pour *M. avium* ssp. *silvaticum*, les 4 souches isolées de pigeon ramier et typées par RFLP1311, sont regroupées au sein d'un profil RFLP1311 unique à 2 bandes rapprochées (Figure 25), différent des profils à 2 bandes attribués à *M. avium* ssp. *avium*, et présentent par ailleurs le même profil VNTR-MIRUs 24231117.

- ▲ **Sous-espèce de *M. avium* non identifiée par amplification de IS901**

Sur les 46 souches présentant une faible amplification de IS901 (*M. avium* ssp. ? sur Figure 25), 7 ont un profil RFLP1311 à deux bandes éloignées, tout en étant isolées du porc (2 souches), du bovin (2 souches), et de l'oiseau (3 souches). Les 39 autres souches de *M. avium* ssp. ? présentent des profils RFLP1311 multi-bandes, tout en étant isolées de porc (32 souches), de bovin (4 souches), de l'environnement d'élevage (2 souches) et de mammifère sauvage (1 souche). Là encore l'identification par amplification PCR de IS901 présente des limites, car des souches avec un profil RFLP1311 multi-bandes associés aux mammifères, ne sont pas clairement identifiées comme *M. avium* ssp. *hominissuis*, et des

souches avec un profil RFLP1311 double bandes éloignées associés aux oiseaux, ne sont pas clairement identifiées comme *M. avium* ssp. *avium*. De plus, parmi les profils RFLP1311 multi-bandes, certaines souches présentant une amplification faible de IS901 (Figure 24 et Figure 25), ont un profil RFLP1311 similaire à 90-100% et un profil VNTR-MIRUs identique avec des souches (IS901-) identifiées comme de *M. avium* ssp. *hominissuis* (2007.00156.00≈ 2007.001228.00, 1999.06686.00≈ 1999.03873.00, 2007.1396≈ 2007.00825.00). Ceci peut être observable pour le grand groupe de profils RFLP1311 à deux bandes éloignées, ou sont intégrés les 7 souches présentant une amplification faible de IS901. En conséquence, l'identification des sous-espèces *avium* et *hominissuis* par amplification PCR de IS901, apparaît de nouveau comme incertaine, notamment du fait que les profils RFLP1311 de ces derniers soient similaires, soit à des profils multi-bandes généralement associées aux *M. avium* ssp. *hominissuis* des mammifères, soit à des profils à double bandes éloignées généralement associés aux *M. avium* ssp. *avium* des oiseaux. De plus, la RFLP1311 a permis de visualiser clairement une séparation taxonomique entre *M. avium* ssp. *hominissuis* associé aux mammifères et *M. avium* ssp. *avium* associé aux oiseaux.

- Epidémiologie

- ▲ **Généralité**

En ce qui concerne l'ensemble attribué à la sous-espèce *hominissuis* (de 1995.01088.00 à 2007.00624.00), des profils RFLP1311 différents présentent des profils VNTR-MIRUs identiques (ex : 1995.01088.00 et 1996.09689.00), et inversement des profils VNTR-MIRUs différents présentent des profils RFLP1311 identiques (ex : 2007.00128.00 et 2007.00156.00). La combinaison de ces deux méthodes serait donc d'un intérêt épidémiologique. Par opposition, en ce qui concerne l'ensemble attribué à la sous-espèce *avium* (de 2003.03646.00 à 2006.00633.00), tous les profils RFLP1311 sont identiques, alors qu'il est possible de dénombrer 9 profils VNTR-MIRUs différents (24131127, 24131137, 21131117, 25131127, 23131127, 22131127, 24231117, 21131118 et 23121127). La VNTR-MIRUs présente donc un intérêt certain pour l'étude épidémiologique de *M. avium* ssp. *avium*, contrairement à la RFLP1311.

- ▲ **Contamination de l'homme et du porc**

L'ensemble des souches humaines typées par RFLP1311 présentent des profils multi-bandes (Figure 24 et Figure 25). De plus, des souches de *M. avium* ssp. *hominissuis* d'origine humaines présentent des profils RFLP1311 similaires à 90-100% avec des souches d'origine porcine dont l'amplification PCR de IS901 est faible (2007.1261≈ 2007.1260≈ 2005.03764.00 et 2007.1396≈ 2007.00825.00), tout en ayant un profil VNTR-MIRUs identique. Tout comme les observations effectuées à partir des résultats RFLP1245, il s'agit là encore du profil VNTR-MIRUs 24221128. Compte tenu des ambiguïtés des résultats d'amplification PCR de IS901, et en accord avec les observations réalisées à partir des résultats de RFLP1245, il semble donc que des transmissions de *M. avium* ssp. *hominissuis* du porc à l'homme ont lieu, ou que ces deux mammifères soient contaminés par une source commune du germe.

▲ *Contamination de l'homme et du bovin*

Comme les observations des résultats VNTR-MIRUs et RFLP1245, une origine de contamination commune ou des transmissions de *M. avium* ssp. *hominissuis* entre l'homme et le bovin sont envisageables en vu des résultats RFLP1311. Effectivement, la souche 1996.06561.00 d'origine bovine (amplification IS901 faible) et la souche *M. avium* ssp. *hominissuis* 2007.1260 d'origine humaine, présentent des profils RFLP1311 à 95% de similitude, ainsi que le même profil VNTR-MIRUs 24221128 (Figure 24 et Figure 25). Des transmissions, ou des sources communes de contamination peuvent aussi être envisagées entre le porc et le bovin, car en accord avec les observations des résultats RFLP1245, des souches avec une amplification faible de IS901 d'origine bovine (1996.06520.00 et 1999.05060.00) ont un profil RFLP1311 similaire à 100% avec des souches d'origine porcine présentant une amplification faible de IS901 (2002.04540.00, 2005.03636.00, 2005.03637.00 et 2005.01841.02). De plus, ces souches ont le même profil VNTR-MIRUs 24221128. Ces souches sont probablement à classer parmi *M. avium* ssp. *hominissuis*, car hormis leur origine et leur profil RFLP1311 multi-bandes, une autre observation similaire peut être faite. En effet, les *M. avium* ssp. *hominissuis* 1996.12939.02 d'origine bovine et 1997.02827.00 d'origine porcine, présentent un profil RFLP1311 similaire à 100% et des profils VNTR-MIRUs très proches, respectivement (0;2)4(2;3)21128 et (0;2)2(2;3)21128. Toute fois, rappelons que la transmission à l'homme de *M. avium* via le bovin présente un faible risque car le bovin contaminé ne présente que des adénites et pas de lésions organiques.

▲ *Contamination des mammifères sauvages et domestiques*

Une souche isolée d'un mammifère sauvage (2001.02244.01) présente un profil RFLP1311 multi-bandes similaire à 90% avec une souche de *M. avium* ssp. *hominissuis* (2007.1270) d'origine humaine mais sans pour autant avoir un profil VNTR-MIRUs identique (Figure 25). L'homme n'étant pas en général au contact direct de la faune sauvage, il est donc envisageable que l'homme et la faune sauvage soit contaminé par *M. avium* ssp. *hominissuis* provenant de l'environnement. Par ailleurs, deux souches isolées de mammifère sauvage et domestiques (2005.01657.00 et 2006.00633.00) présentent un profil RFLP1311 à deux bandes éloignées, généralement associé aux oiseaux. En conséquence, il est envisageable que *M. avium* ssp. *avium* contamine la faune sauvage, par exemple via les fientes d'oiseau ou de volaille.

▲ *Contamination du porc via l'environnement*

Pour les contaminations environnementales, les résultats RFLP1311 suggèrent que la terre pourrait être à l'origine de la transmission de *M. avium* ssp. *hominissuis* au porc. Effectivement, l'une des souches isolée de terre (1999.02794.01) présente un profil RFLP1311 similaire à 90% à un profil RFLP1311 issu qu'une souche d'origine porcine (1995.02051.00). Néanmoins, cela ne reste qu'une hypothèse car ces deux souches présentent une amplification faible de IS901 et non pas le même profil VNTR-MIRUs (Figure 24).

▲ *Contamination de l'environnement et des mammifères par les oiseaux*

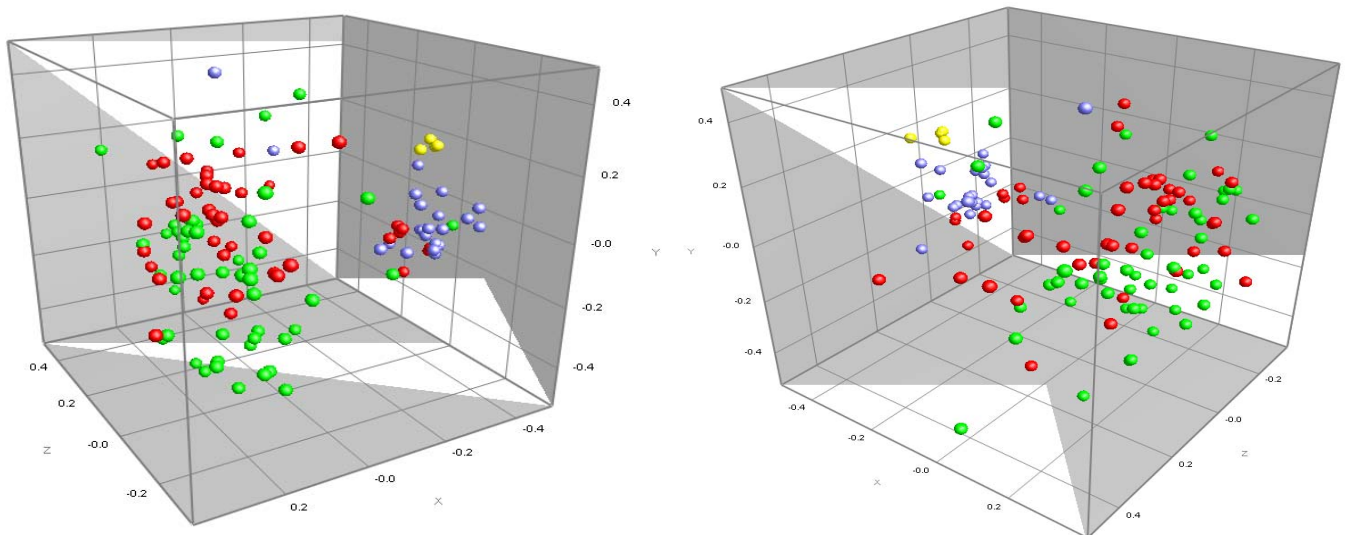
En ce qui concerne les profils RFLP1311 à deux bandes éloignés, il est difficile d'émettre des hypothèses car le fait que deux bandes soient uniquement présentes sur les profils, ne permet pas de caractériser finement les souches. Néanmoins, si l'on ne tient pas compte des résultats ambigus des amplifications de IS901, et que l'on considère que ces profils RFLP1311 à deux bandes éloignés soient initialement d'origine aviaire, le fait d'observer ces derniers pour des souches isolées de mammifères, pourrait laisser supposer que ceci soient contaminés dans de rares cas via les fientes d'oiseaux ou de volailles contaminés par *M. avium* ssp. *avium*. Ceci est d'ailleurs en accord avec l'étude qui avait observé ce type de transmission au porc pour une souche du sérotype 2, attribuées à la sous-espèce *avium* (Cvetnic *et al.* 1996).

▲ *Cas particulier de la contamination du pigeon ramier*

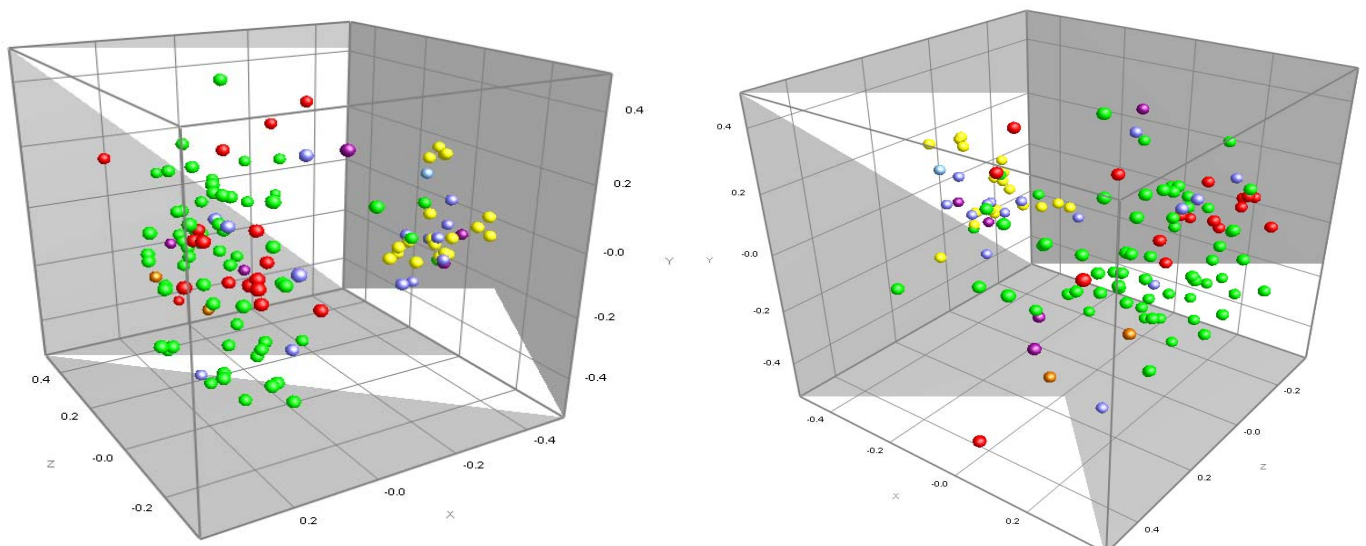
D'autre par, il est à noter que le profil RFLP1311 commun aux quatre souches de *M. avium* ssp. *silvaticum* isolées de pigeon ramier, n'est observable pour aucune autre souche de l'étude. Ceci confirme que *M. avium* ssp. *silvaticum* est bien l'agent de la tuberculose aviaire chez le pigeon ramier, et qu'il n'est à priori pas transmissible à d'autres espèces d'oiseaux ou de mammifères utilisés dans l'étude. Néanmoins, la norme actuelle de recherche du MAC autre que la sous-espèce *paratuberculosis* (NF U 47-104), ne fait pas intervenir de mycobactine, qui est nécessaire à la croissance de la sous-espèce *silvaticum*. En conséquence cette sous-espèce pourraient contaminer d'autres espèces que le pigeon ramier, car effectivement celle-ci n'est pas systématiquement recherchée par bactériologie normalisée.

III.4 / Combinaison des Typages RFLP1311 et VNTR-MIRUs

Le fait que des problèmes analytiques n'ont permis que de typer une faible quantité de souche par RFLP1245, n'a pas rendu possible de combiner les résultats de cette méthode, aux résultats obtenus par RFLP1311 et VNTR-MIRUs. Néanmoins, la combinaison des profils RFLP1311 et VNTR-MIRUs présentant un DI=0,937 (Annexe 13 et Annexe 14), a permis de visualiser en trois dimensions les distances génétiques existantes entre les sous-espèces de *M. avium*, et entre les origines d'isolement (Figure 26).



a : *M. avium* ssp *avium* (amplification IS901 fortement positif), *M. avium* ssp *hominissuis* (amplification IS901 négative), *M. avium* ssp ? (amplification IS901 faiblement positif), *M. avium* ssp *silvaticum*



b : Bovin, Oiseau, Porc, Environnement, Humain, Mammifère sauvage et domestiques

Figure 26 : Représentation en trois dimensions des distances génétiques existantes entre les combinaisons des profils RFLP1311 et VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007), en fonction de la sous-espèce de *M. avium* (a) et de l'origine de l'isolement des souches d'étude (b)

La combinaison des résultats de typage RFLP1311 et de typage VNTR-MIRUs (Figure 26 a), distinguent les profils de *M. avium* ssp. *avium*, de *M. avium* ssp. *hominissuis*, ainsi que de *M. avium* ssp. *silvaticum*. En effet, les nuages de profils de ces trois sous-espèces (jaune : ssp. *silvaticum* ; bleu : ssp. *avium* ; vert : ssp. *hominissuis*) sont homogènes et distincts entre eux (Figure 26 a) à de rares exceptions (3 profils *hominissuis* vert dans le nuage de profil *avium* bleu, qui seraient dus à l'identification PCR non spécifique). Par ailleurs, il est remarquable que le nuage de profil rouge (amplification IS901 faiblement positif) intègre à la fois des parties du nuage bleu (ssp. *avium*) et du nuage vert (ssp. *hominissuis*). Il est donc très probable que des *M. avium* présentant des amplifications IS901 faibles, soient des *M. avium* ssp. *avium* ou des *M. avium* ssp. *hominissuis*.

Par comparaison des sous-espèces de *M. avium* (Figure 26 a) aux origines des isollements (Figure 26 b), il est remarquable que les sous-espèces *avium* (bleu sur Figure 26 a) et *silvaticum* (jaune sur Figure 26 a) correspondent majoritairement à des isollements d'origine aviaire (oiseau, volaille, pigeon : en jaune sur Figure 26 b), et que la sous-espèce *hominissuis* (vert sur Figure 26 a) correspond majoritairement à des isollements de mammifères comme le porc (vert sur Figure 26 b) et l'homme (rouge sur Figure 26 b). Il apparaît donc que *M. avium* ssp. *hominissuis* contamine particulièrement l'homme et le porc, et que *M. avium* ssp. *avium* contamine particulièrement les oiseaux, hormis le pigeon qui est contaminé spécifiquement par *M. avium* ssp. *silvaticum*. Par ailleurs, le porc (vert sur Figure 26 b) peuvent aussi être contaminés par la sous-espèce *avium* (bleu sur Figure 26 a), et les oiseaux (jaune sur Figure 26 b) peuvent dans de rares cas être contaminés par la sous-espèce *hominissuis* (vert sur Figure 26 a). De plus, il est observable que les souches de bovin (bleu sur Figure 26 b), et de mammifères sauvages et domestiques (violet sur Figure 26 b) présentent des profils intégrés aux nuages bleu (Figure 26 a) attribués à la sous-espèce *avium*, et aux nuages vert (Figure 26 a) attribué à la sous-espèce *hominissuis*. Le bovin et les mammifères sauvages et domestiques, peuvent donc indépendamment être contaminés par *M. avium* ssp. *hominissuis* et *M. avium* ssp. *avium*. En ce qui concerne l'environnement (marron sur Figure 26 b), il semble que ce dernier contient la sous-espèce *hominissuis* (nuage vert sur Figure 26 a). Par ailleurs, la sous-espèce *avium* (nuage bleu sur Figure 26 a) n'a pas été détectée de façon certaine dans l'environnement (marron sur Figure 26 b), mais sa présence chez le porc, le bovin, ainsi que les mammifères sauvages et domestiques, fait penser à des contaminations d'origine environnementale. Néanmoins, il serait intéressant d'ajouter à l'étude des souches d'origine environnementale, car leur faible nombre dans la présente étude ne nous permet pas de donner du poids à certaines de ces hypothèses. Par exemple des souches isolées d'aliments, ou de l'eau utilisée dans les élevages pourraient être intégrées à l'étude.

En conclusion, cette étude révèle que les constituants du MAC, ont des particularités moléculaires spécifiques, identifiées par le typage RFLP1311 et typage VNTR-MIRUs, permettant de les identifier, et de suivre les voies de contamination qu'ils empruntent (Figure 27).

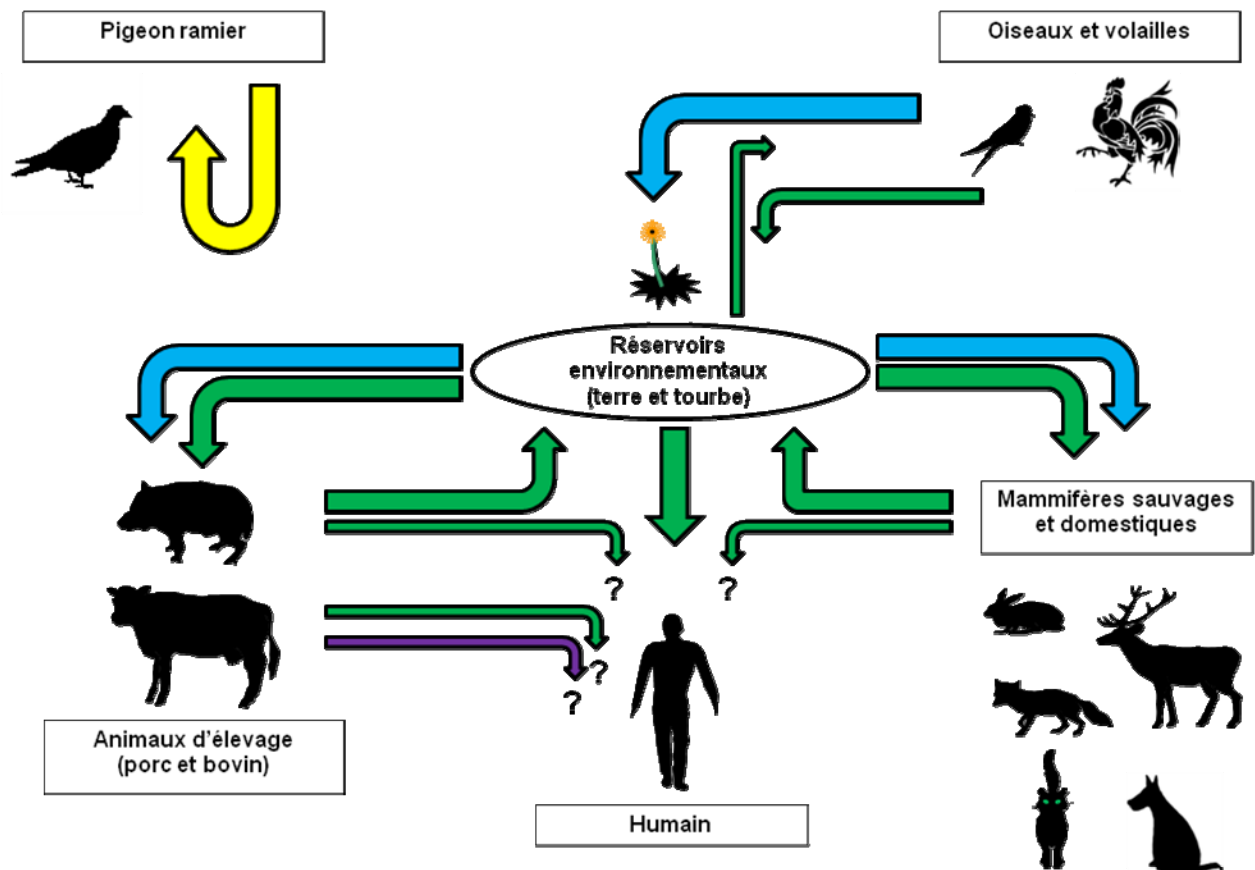


Figure 27 : Représentation selon cette étude des voies de contaminations probables, hypothétiques (?), majoritaires (flèches épaisses) et minoritaires (flèches minces) entre l’environnement, l’homme, le bovin, les mammifères sauvages et domestiques, l’oiseau, le porc et/ou le pigeon par *M. avium* ssp. *avium* (bleu) ; *M. avium* ssp. *hominissuis* (vert) ; *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (violet) et/ou *M. avium* ssp. *silvaticum* (jaune)

L’homme serait donc probablement contaminé par des constituants du MAC, en particulier *M. avium* ssp. *hominissuis* provenant de l’environnement ou d’animaux d’élevage comme le porc, ainsi que par *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, qui infecte le bovin (maladie de Johne) et qui est par ailleurs soupçonné d’intervenir dans une pathologie humaine (maladie de Crohn).

Néanmoins, cette étude n’a pas identifié *M. avium* ssp. *avium* chez l’homme, alors que cette sous-espèce est détectée chez des mammifères sauvages, domestiques et d’élevage. La sous-espèce *avium*, contrairement à la sous-espèce *hominissuis*, contaminerait l’homme de façon épisodique. Il serait donc intéressant d’intégrer à l’étude des souches d’origine humaine, qui ont été attribuées à *M. avium* ssp. *avium* par sérotypage avant la définition de la sous-espèce *hominissuis*, afin de vérifier si, comme la littérature le suggère, la sous-espèce *avium* a remplacé la sous-espèce *hominissuis* en ce qui concerne les infections chez l’homme (§ I.1.f /).

IV / Conclusion

IV.1 / Identification des sous-espèces du MAC par PCR

En ce qui concerne les souches présentant une amplification PCR de IS1245 positive et une amplification PCR de IS901 faiblement positive, une étude indique que IS1245 peut-être présent chez des *Mycobacterium* autres que celles du MAC (Keller *et al.* 2002). Néanmoins, du fait des caractéristiques culturales et biochimiques des souches intégrées à l'étude, il semble très peu probable que ces dernières n'appartiennent pas à *M. avium*. Ces caractéristiques culturales et biochimiques non présentées, ainsi que la présence de IS1245, indiqueraient que les souches d'étude appartiennent bien au *M. avium* et non pas à *M. intracellulare*. Comparativement à la souche de référence *M. avium* ssp. *avium* ATCC 25291, l'observation d'amplifications IS901 faibles pour 64 souches de l'étude sur 168 (Figure 11), peut être interprété de façon différentes. Il s'agirait vraisemblablement que IS901 soit présent en un différent nombre de copie en fonction de la sous-espèce. Effectivement, nous avons pu observer que les souches présentant une faible amplification PCR de IS901, présentaient des profils RFLP1245, RFLP1311, ainsi que VNTR-MIRUs attribués à *M. avium* ssp. *hominissuis* ou *M. avium* ssp. *avium* pour les méthodes RFLP1311 et VNTR-MIRUs. Un grand nombre de copie de IS901 dans le génome de *M. avium* ssp. *avium* isolé des oiseaux, expliquerait que pour un même nombre de cycle d'amplification, la réponse obtenue pour cette sous-espèce, soit plus importante que celle observée avec *M. avium* ssp. *hominissuis* isolé des mammifères, qui ne présenterait pas, ou présenterait en un faible nombre de copie IS901. Si tel est le cas, en désaccord avec les études qui ont décrites et utilisés IS901 pour l'identification (Dvorska *et al.* 2004; Kunze *et al.* 1992; Pavlik *et al.* 2000), la méthode d'identification par amplification PCR de IS901, ne serait donc pas spécifique. En effet, avec des cycles d'amplification importants ou une polymérase très performante, il serait peut être possible de détecter IS901 à partir d'un génome présentant un faible nombre de copie de cet élément d'insertion.

IV.2 / Identification des sous-espèces du MAC par typage moléculaire

Il a été déterminé que la combinaison de la méthode RFLP1311 à la méthode VNTR-MIRUs sur 8 loci, aussi bien que ces deux méthodes utilisées séparément, permettaient de différencier les quatre sous espèces du MAC. Par ailleurs, le typage RFLP1311 a permis de différencier les sous-espèces *M. avium* ssp. *avium*, ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, et le typage VNTR-MIRUs sur 8 loci a permis de différencier les sous-espèces *M. avium* ssp. *avium*, ssp. *hominissuis*, ssp. *silvaticum* et ssp. *paratuberculosis*. En particulier, le locus 3 qui présente deux TR chez *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, et 1 TR chez les autres sous-espèces du MAC (Tableau 3), ainsi que le locus 25 qui présente 1 TR pour la sous-espèce *avium* et 2, 3 ou 4 pour la sous-espèce *hominissuis* (Figure 15, Figure 16 et Figure 17).

IV.3 / Etude épidémiologique des sous-espèces du MAC par typage moléculaire

L'étude épidémiologique de *M. avium* ssp. *avium*, ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, est réalisable par typage VNTR-MIRUs avec la combinaison des loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 10 et 32, alors que les loci 3 et 7 ne rajoutent pas de pouvoir de discrimination additionnel du fait de leur indice de discrimination faible de 0,047 et 0,035 (Figure 14). Du fait des pouvoirs de discrimination proches obtenus par typage RFLP1245 (DI=0,997), typage RFLP1311 (DI= 0,933), typage VNTR-MIRUs (DI=0,923) et typage par combinaison RFLP1311 et VNTR-MIRUs (DI=0,937), ces méthodes peuvent donc être utilisées pour l'étude épidémiologique de *M. avium* ssp. *avium*, ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*. A ce sujet, il est à noter que la méthode VNTR-MIRUs caractérise mieux *M. avium* ssp. *avium* (9 groupes), que ne le fait la méthode RFLP1311 (1 groupe). Par ailleurs, contrairement au typage VNTR-MIRUs, les pouvoirs de discrimination calculés pour la RFLP dépendent des dendrogrammes réalisés. Ces derniers dépendent donc du choix des indices de tolérance et d'optimisation, qui sont appliqués au logiciel BIONUMERICS. Ceci n'étant pas le cas pour la méthode de typage VNTR-MIRUs, cette dernière est donc plus fiable que la méthode RFLP. De plus la méthode VNTR-MIRUs est simple et rapide à mettre en œuvre du fait qu'elle utilise du matériel commun de PCR, et que les résultats peuvent être obtenus en 24h à partir d'une matrice faible en ADN. La RFLP1245 et 1311 restent des méthodes complexes mettant en œuvre du matériel spécifique, et sont longues à réaliser en comptant 5j en partant d'une concentration cellulaire forte, ou 2 à 3 mois si la souche de *M. avium* doit être mise en culture. A ce sujet, contrairement au typage RFLP, le typage VNTR-MIRUs a pour avantage de ne pas nécessiter une matrice d'ADN pure et concentrée. De plus, les comparaisons inter-essais et inter-laboratoires des profils multi-bandes de RFLP nécessitent l'utilisation d'un logiciel adapté, alors que la comparaison des profils VNTR-MIRUs peut se faire directement à partir de leur signature numérique. De plus, par opposition au typage VNTR-MIRUs, le typage du MAC par RFLP, nécessite l'utilisation de différentes séquences d'insertion en fonction de la sous-espèce. Effectivement, le typage RFLP900 est la référence chez *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et le typage RFLP1245 est la référence chez *M. avium* ssp. *avium* ; ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum*, alors que le typage VNTR-MIRUs permet de caractériser ces quatre sous-espèces du MAC sans modification de la méthode. De plus nous avons vu que comparativement à la RFLP1311, la RFLP1245 nécessite plus d'ADN pour l'hybridation. En conclusion, la RFLP1245-1311 et la VNTR-MIRUs sont des méthodes de caractérisation fine des *M. avium*, et le typage VNTR-MIRUs apparaît comme une méthode de caractérisation plus rapide, plus simple à mettre en place, produisant des profils numériques comparables sans utiliser obligatoirement l'analyse informatique, et pouvant typer en même temps les quatre sous-espèces du MAC.

V / Perspectives

V.1 / Les méthodes d'étude épidémiologique du MAC

Les méthodes de typage moléculaire du MAC semblent se substituer aux méthodes classiques de sérotypage pour la réalisation des études épidémiologiques. Malgré des résultats probants de l'utilisation de cette méthode d'agglutination anticorps-antigène pour détecter un sérotype particulier de *M. avium*, (Thoen *et al.* 1976) celle-ci devient plus complexe lorsque la recherche doit s'effectuer sur la multitude des sérovars de *M. avium* existant (Muscoplat *et al.* 1975). D'autre part, il est reconnu que les infections à *M. avium* chez les personnes atteintes du SIDA, sont constituées de plusieurs clones de caractéristiques différentes. Ces infections polyclonales posent des problèmes pour les traitements par chimiothérapies des infections du MAC (Falkinham 1994). Il est donc nécessaire d'appliquer une méthode, la plus discriminante possible pour caractériser les sous-espèces du MAC. Pour cela, la combinaison du typage RFLP1311 au typage VNTR-MIRUs pourraient être une méthode permettant de mieux caractériser les constituants du MAC. D'autre par, nous avons vu que la méthode de sérotypage, historiquement utilisée par étudier le MAC, avait permis d'observer des voies de contamination, qui n'ont pas été observées dans cette étude avec les méthodes de biologie moléculaire, par exemple le sérotype 1 attribué à *M. avium ssp. avium*, qui a été observé chez les oiseaux, mais aussi chez l'humain. Ainsi, il serait intéressant de caractériser par RFLP et VNTR-MIRUs des souches qui ont déjà été sérotypées, afin de vérifier l'exactitude des sous-espèces attribuées à chaque sérotype, et de déterminer si des profils génétiques sont corrélés aux sérotypes.

V.2 / La méthode de typage VNTR-MIRUs

Les avantages de la méthode de typage VNTR-MIRUs, en termes de rapidité, de simplicité et de fiabilité, pourraient être optimisés par l'augmentation du pouvoir de discrimination. Cela pourrait passer par la recherche d'autres loci présentant des VNTR-MIRUs polymorphes. Effectivement, la présente étude a consisté à appliquer sur *M. avium ssp. avium*, *ssp. hominisuis* et *ssp. silvaticum*, la méthode de typage VNTR-MIRUs développée pour *M. avium ssp. paratuberculosis* (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007). L'utilisation d'autres VNTR-MIRUs polymorphes chez *M. avium ssp. avium*, *ssp. hominisuis* et *ssp. silvaticum*, pourrait donc augmenter le pouvoir de discrimination globale de la méthode. A ce sujet, une étude épidémiologique en Amérique du Sud, a identifié chez *M. avium ssp. hominissuis* et *M. avium ssp. paratuberculosis*, 5 répétitions en tandem communes avec une structure MIRUs et 17 répétitions en tandem communes sans structure MIRUs. Sur les 21 souches de *M. avium ssp. hominissuis* et les 26 souches de *M. avium ssp. paratuberculosis* analysées dans cette étude, 6 loci VNTR-MIRUs se sont avérés polymorphes (Romano *et al.* 2005), et pourraient être différents de ceux utilisés dans la présente étude.

V.3 / Les méthodes de typage RFLP

En ce qui concerne le traitement informatique par BIONUMERICS des résultats RFLP, il serait intéressant d'utiliser lors des migrations, des marqueurs de taille marqués par la peroxydase, afin d'être révélés par chimioluminescence avec les profils des souches. En effet, cela permettrait d'éviter l'étape lourde de normalisation des distances de migration, car cela serait géré par BIONUMERICS qui corrigerait ces dernières en fonction de la corrélation effectuée entre sont marqueur de taille interne et les marqueurs de taille révélés avec les profils. Par ailleurs, la difficulté à déterminer le pourcentage de similitude à partir duquel des profils RFLP peuvent être considérés comme identiques, devrait être étudié. Cela passerait par de multiples typages RFLP d'une même souche, afin de déterminer pour quelle optimisation et quelle tolérance, le logiciel BIONUMERICS classe les profils RFLP de ces dernières dans un même groupe.

V.4 / Intégration à l'étude de souches d'autres origines

Nous avons vu que le faible nombre de souches isolées de l'environnement ne permettait pas d'émettre des hypothèses claires. L'apport de souches issues de la terre, mais aussi de l'eau voir même des aliments utilisés dans les élevages de porc, permettrait de déterminer plus précisément comment le porc est infecté. Les porcs, dont les souches ont été utilisées dans cette étude, sont des porcs d'élevages intensifs couverts. L'intégration à l'étude de souches isolées de porc élevés en pleine aire, permettraient de déterminer si ces derniers sont contaminés par les même membres du MAC qui contaminés le porc d'élevage. Par ailleurs, nous avons vu que la norme actuelle de sélection des membres du MAC autre que la sous-espèce *paratuberculosis* (NF U 47-104), ne permettait pas d'isoler la sous-espèce *silvaticum*, du fait qu'elle n'utilise pas de mycobactine au moment de l'isolement. Cet ajout de mycobactine permettrait de vérifier si la sous-espèce *silvaticum* peut être isolée dans d'autres espèces que le pigeon ramier.

Références bibliographiques

- Anonymous, 2004. The diagnosis of Johne's disease. *Surveillance*, **31**, (3), 8-13.
- Aronson T., Holtzman A., Glover N., Boian M., Froman S., Berlin O. G. W., Hill H. and Stelma G., 1999. Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, (4), 1008-1012.
- Bartos M., Hlozek P., Svastova P., Dvorska L., Bull J., Matlova L., Parmova I., Kuhn I., Stubbs J., Moravkova M., Kintr J., Beran V., Melicharek I., Ocepek M. and Pavlik I., 2006. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by accu-probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *Journal of Microbiology Methods*, **64**, (1), 333-345.
- Bauer J. and Andersen A. B., 1999. Stability of insertion sequence IS1245, a marker for differentiation of *Mycobacterium avium* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, (2), 442-444.
- Bauer J., Andersen Å. B., Askgaard D., Giese S. B. and Larsen B., 1999. Typing of clinical *Mycobacterium avium* complex strains cultured during a 2-year period in Denmark by using IS1245. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, (3), 600-605.
- Biet F., Boschioli M. L., Thorel M. F. and Guilloteau L. A., 2005a. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, **36**, (1), 411-436.
- Biet F., Thibault V., Grayon M., Overduin P., Boschioli M. L., Hubbans C., Guilloteau L. A. and Supply P., 2005b. Development of VNTR typing of *M. avium* subsp paratuberculosis : comparison of results with those obtained by IS900 RFLP. *Molecular Biology, Microbiology and Culture*, **8ICP**, (1), 366-374.
- Birkness K. A., Swords W. E., Huang P. H., White E. H., Dezzutti C. S., Lal R. B. and Quinn F. D., 1999. Observed differences in virulence-Associated phenotypes between a human clinical isolate and a veterinary isolate of *Mycobacterium avium*. *Infection and Immunity*, **67**, (9), 4895-4901.
- Brown J. and Neuman M. A., 1979. Lesions of swine lymph nodes as a diagnostic test to determine Mycobacterial infection. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, (4), 740-743.
- Cangelosi G., Palermo C. O. and Bermudez L. E., 2001. Phenotypic consequences of red-white colony type in *Mycobacterium avium*. *Micrbiology*, **147**, (1), 527-533.
- Chin D. P., Hopewell P. C., Yajko D. M., Vittinghoff E., Horsburgh R., Hadley J. W. K., Stone E. N., Nassos P. S., Ostroff S. M., Jacobson M. A., Matkin C. C. and Reingold A. L., 1994. *Mycobacterium avium* complex in the respiratory or gastrointestinal tract and the risk of *M. avium* complex bacteremia in patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, **169**, (1), 289-295.
- Cocito C., Gilot P., Coene M., de Kesel M., Poupard P. and Vannuffel P., 1994. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **3**, (7), 328-345.
- Collins D. M., Cavaignac S. and de Liste G., 1997. Use four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Molecular and Cellular Probes*, **11**, (1), 373-380.
- Cvetnic Z., Ocepek M., Kovacic H. and Mitak M., 1996. Environmental source of *Mycobacterium avium* complex in pig breeding farms. *Zagreb Veterinary Faculty Ljubljana*, **33**, (2), 181-189.
- Denis M., 1994. Immunomodulatory events in *Mycobacterium avium* infections. *Laboratory and Clinical Aspect of M. avium epidemic*, **145**, (225-9), 225-229.
- Dvorska L., Matlova L., Bartos M., Parmova I., Bartl J., Svastova P., Bull J. T. and Pavlik I., 2004. Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Veterinary Microbiology*, **99**, (1), 239-250.
- Ellsworth S. R., Kirkbride C. A., Johnson D. D. and Vorhies M. W., 1979. *Mycobacterium avium* abortion in a sow. *Veterinary Pathology*, **16**, (1), 310-317.
- el-Zaatar F. A. K., Naser S. A., Markesich D. C., Kalter D. C., Engstand L. and Graham D. Y., 1996. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, (9), 2240-2245.
- Falkinham J. O., 1994. Epidemiology of *Mycobacterium avium* infections in the pre- and post-HIV era. *Research in Microbiology*, **145**, (3), 169-72.
- Falkinham J. O., Norton C. D. and LeChevallier M. W., 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, (3), 1225-1231.
- Fordham von Reyn C., Barber T. W., Arbeit R. D., Sox C. H., O'Connor G. T., Brindle R. J., Gilks C. F., Hakkarainen K., Ranki A., Bartholomew C., Edwards J., Tosteson A. N. A. and Magnusson M., 1993. Evidence of infection with *Mycobacterium avium-Mycobacterium*

intracellulare complex among health subjects : An international study of dominant *Mycobacterial* skin test reactions. *Journal of Infectious Diseases*, **168**, (1), 1553-1558.

Frehel C., de Chastellier C. and Lang T., 1986. Evidence for inhibition of fusion of the lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infection and Immunity*, **52**, (1), 252-262.

Ghadiali A. H., Strother M., Naser S. A., Manning E. J. B. and Sreevatsan S., 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, (11), 5345-5348.

Green E. P., Tizard M. L. V., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon J. and Taylor G., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, **17**, (22).

Guerrero C., Bernasconi C., Burki D., Bodmer T. and Telenti A., 1995. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, (2), 304-307.

Hoffner S. E., Källenius G., Petri B., Brennan P. J. and Tsang A. Y., 1990. Serovars of *Mycobacterium avium* complex isolated from patients in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, (6), 1105-1107.

Hunter P. R. and Gaston M. A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems : an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**, (1), 2465-2466.

Inderlied C. B., Kemper C. A. and Bermudez L. M., 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews*, **6**, (3), 266-310.

Johansen T. B., Djonne B., Jensen M. R. and Olsen I., 2005. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, (5), 2500-2502.

Johansen T. B., Olsen I., Jensen M. R., Dahle U. R., Holstad G. and Djonne B., 2007. New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiology*, **7**, (14), 1-9.

Kahana L. M., Kay J. M., Yakrus M. A. and Wasserman S., 1997. *Mycobacterium avium* complex infection in an immunocompetent young adult related to hot tub exposure. *Chest*, **111**, (1), 242-245.

Kasai H., Ezaki T. and Harayama S., 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing *Mycobacteria* by their *gyrB* sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, (1), 301-308.

Kauppinen J., Hintikka E. L., Llivanainen E. and Katila M. L., 2001. PCR-based typing of *Mycobacterium avium* isolates in an epidemic among farmed lesser white-fronted geese (*Anser erythropus*). *Veterinary Microbiology*, **81**, (1), 41-50.

Keller A. P., Beggs M. L., Amthor B. and Bruns F., 2002. Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in nontuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, (5), 1869-1872.

Komijn R. E., de Haas P. E. W., Schneider M. M. E., Eger T., Nieuwenhuijs J. H. M., van den Hoek R. J., Bakker D., van Zijl Erveld F. G. and van Soelingen D., 1999. Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in the Netherlands and comparison of IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism patterns of porcine and human isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, (5), 1254-1259.

Kunze Z. M., Portaels F. and McFadden J. J., 1992. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, (9), 2366-2372.

Kunze Z. M., Wall S., Appelberg R., Silva M. T., Portaels F. and McFadden J. J., 1991. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Molecular Microbiology*, **5**, (9), 2265-2272.

Le Dantec C., Duguet J. P., Montiel A., Dumoutier N., Dubrou S. and Vincent V., 2002a. Chlorine disinfection of atypical *Mycobacteria* isolated from a water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, (3), 1025-1032.

Le Dantec C., Duguet J. P., Montiel A., Dumoutier N., Dubrou S. and Vincent V., 2002b. Occurrence of *Mycobacteria* in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, (11), 5318-5325.

Legrand E., Sola C. and Rastogi N., 2000. Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* : marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, **93**, (3), 155-217.

Matlova L., Dvorska L., Ayele W. Y., Bartos M., Amemori T. and Pavlik I., 2005. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with *Mycobacteria* as a supplement. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, (3), 1261-1268.

- Matlova L., Dvorska L., Palecek K., Maurenc L., Bartos M. and Pavlik I., 2004. Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominisus* of serotypes 6 and 8 isolates from pigs and environments. *Veterinary Microbiology*, **102**, (1), 227-236.
- Maugein J., Dailloux M., Carbonnelle B., Vincent V. and Grosset J., 2005. Sentinel-site surveillance of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, **26**, (1), 1092-1096.
- Mazars E., Lesjean S., Banuls A. N., le Gilbert M., Vincent V., Gicquel B., Tibayrenc M., Loch C. and Supply P., 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, (4), 1901-1906.
- Mijs W., de Haas P., Rossau R., van der Laan T., Rigouts L., Portaels F. and van Soolingen D., 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominisus* for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, (1), 1505-1518.
- Möbius P., Lentzsch P., Moser I., Naumann L., Martin G. and Köhler H., 2006. Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominisus* isolates from man, pig, and cattle. *Veterinary Microbiology*, **117**, (1), 284-291.
- Mueller-Ortiz S. L., Wanger A. R. and Norris S. J., 2001. Mycobacterial Protein HbhA Binds Human complement component C3. *Infection and Immunity*, **69**, (12), 7501-7511.
- Muscoplat C. C., Thoen C. O., Chen A. W., Rakich P. M. and Johnson D. W., 1975. Development of specific lymphocyte immunostimulation and tuberculin skin reactivity in swine infection with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*. *American Journal of Veterinary Research*, **36**, (8), 1167-1171.
- Oelemann M. C., Diel R., Vatin V., Haas W., Rüsche-Gerdes S., Loch C., Niemann S. and Supply P., 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-Variable-Number Tandem-Repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, (3), 691-697.
- Pavlik I., Svastova P., Bartl J., Dvorska L. and Rychlik I., 2000. Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **7**, (2), 212-217.
- Pfaller S.L., Aronson T.W., Holtzman A.E. and Covert T.C., 2007. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* complex isolates recovered from southern California. *Journal of Medical Microbiology*, **56**, (DOI 10.1099), 1152-1160.
- Picardeau M., Varnerot A., Lecompte T., Brel F., May T. and Vincent V., 1997. Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, (10), 2503-2510.
- Portaels F., 1995. Epidemiology of Mycobacterial Diseases. *Clinics in Dermatology*, **13**, (1), 207-222.
- Prinzis S., Rivoire B. and Brennan P. J., 1994. Search for the Molecular Basis of Morphological Variation in *Mycobacterium avium*. *Infection and Immunity*, **62**, (5), 1946-1951.
- Ramasoota P., Chasiripornchai N., Källenius G., Hoffner S. E. and Svenson S. B., 2001. Comparison of *Mycobacterium avium* complex (MAC) strains from pigs and humans in Sweden by random amplified polymorphic DNA (RAPD) using standardized DNA. *Veterinary Microbiology*, **78**, (1), 251-259.
- Rastogi N., Goh K. S. and Byskier A., 1993. *In vitro* activity of roxithromycin against 16 species of atypical *Mycobacteria* and effect of pH on its radiometric MICs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**, (7), 1560-1562.
- Reed C., Fordham von Reyn C., Chamblee S., Ellerbrock T.V., Johnson J.W., Marsh B.J., Johnson L.S., Trenchel R.J. and Horsburgh C.R., 2006. Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. *American Journal of Epidemiology*, **164**, (1), 32-40.
- Ritacco V., Kremer K., van der Laan T., Pijnenburg J. E. M., de Haas P. E. W. and Van Soolingen D., 1998. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex : relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *International Journal of Tuberculous Lung Diseases*, **2**, (3), 242-251.
- Romano M. I., Amadio A., Bigi F., Klepp L., Etchehoury I., Llana M. N., Morsella C., Paolicchi F., Pavlik I., Bartos M., Leão S. C. and Cataldi A., 2005. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Veterinary Microbiology*, **110**, (1), 221-237.

- Schaible U. E., Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P. H. and Russell D. G., 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *Journal of Immunology*, **160**, (3), 1290-1296.
- Schricke E. and Thorel M. F., 1980. Tuberculose dans des élevages industriels de poules d'oeufs de consommation. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **53**, (1), 295-302.
- Screenu V. B., Kumar P., Nagaraju J. and Nagarajaram A., 2007. Simple sequence repeats in mycobacterial genomes. *Journal of Biosciences*, **32**, (1), 3-15.
- September S. M., Brözel V. S. and Venter S. N., 2004. Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, (12), 7571-7573.
- Shiratsuchi H., Johnson J. L. and Ellner J. J., 1994. *Mycobacterium avium* : pathogenicity in HIV1 infection. *Research in Microbiology*, **145**, (3), 230-236.
- Songer J. G., Bicknell E. J. and Thoen C. O., 1980. Epidemiological investigation of swine tuberculosis in Arizona. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **44**, (1), 115-120.
- Steed K. A. and Falkinham J. O., 2006. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, (6), 4007-4011.
- Straw B. E., D'Allaire S., Mengeling W. L. and Taylor J. T. (1999). Bacterial diseases. Ames, Iowa, USA, Iowa State University Press.
- Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsç-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M. C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Loch C. and van Soolingen D., 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-Variable-Number Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, (12), 4498-4510.
- Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., Van Soolingen D. and Loch C., 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, (10), 3563-3571.
- Supply P., Magdalena J., Himpens S. and Loch C., 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a Mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology*, **26**, (5), 991-1003.
- Supply P., Mazars E., Lesjean S., Vincent V., Gicquel B. and Loch C., 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, **36**, (3), 762-771.
- Tanaka E., Kimoto T., Matsumoto H., Tsuyuguchi K., Suzuki K., Nagai S., Shimadzu M., Ishibatake H., Murayama T. and Amitani R., 2000. Familial pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **161**, (5), 1643-7.
- Thibault V. C., Grayona M., Boschirolì M. L., Hubbans C., Overduind P., Stevensone K., Gutierrez M. C., Supply P. and Biet F., 2007. New variable number tandem repeat markers for typing *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains : comparison with IS900 RFLP and IS1245 RFLP typing. *future publication*.
- Thoen C. O., Johansen D. W., Himes E. M., Menke S. B. and Muscoplat C. C., 1976. Experimentally induced *Mycobacterium avium* serotype 8 infection in swine. *American Journal of Veterinary Research*, **37**, (2), 177-181.
- Thorel M. F., 1978. A propos de l'incidence de *Mycobacterium avium* dans la tuberculose bovine. *Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique de France*, **62**, (6), 3-7.
- Thorel M. F., 1980. Note sur l'étude comparative des sérotypes des souches de *Mycobacterium avium* isolées de l'homme et de l'animal. *Annals de Microbiologie de l'Institut Pasteur*, **131**, (A), 71-76.
- Thorel M. F., 1989. Relationship between *Mycobacterium avium*, *M. paratuberculosis* and mycobacteria associated with Crohn's disease. *Annals de Recherches Vétérinaires*, **20**, (1), 417-429.
- Thorel M. F., Huchzermeyer H., Weiss R. and Fontaine J. J., 1997. *Mycobacterium avium* infections in animals. *Veterinary Research*, **28**, (1), 439-447.
- Thorel M. F., Krichevsky M. and Lévy-Frèbault V. V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **40**, (3), 254-260.

- Tirkkonen T., Pakarinen J., Moisander A. M., Ma kinen J., Soini H. and Ali-Vehmas T., 2007. High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis. *Veterinary Microbiology*, **10.1016/j.vetmic.2007.05.005**.
- Tortoli E., 2006. The newmycobacteria : an update. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, **48**, (1), 159-178.
- Tsukamura M., Mizuno S., Murata H., Nemoto H. and Yugi H., 1982. Relationship between serotype and certain biological and biochemical characteristics of strains of the *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* complex. *Microbiology and Immunology*, **26**, (10), 871-875.
- Valerga M., Cugliari M., Cefalo E. and Martin M., 2007. Infección por *Mycobacterium avium* en un paciente trasplantado renal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **25**, (4), 289-95.
- van Soolingen D., Bauer J., Ritacco V., Cardoso S. L. O., Pavlik I., Vincent V., Rastogi N., Gori A., Bodmer T., Garzelli C. and Garcia M. J., 1998. IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates : proposal for standardization. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, (10), 3051-3054.
- Viallier J., Dabrigeon J. and Viallier G., 1976. Isolement de mycobactéries atypiques à partir de ganglions de porcs présumés sains. *Bulletin de la Société des Sciences vétérinaires et de Médecine comparée de Lyon*, **78**, (3), 137-140.
- Wang H. H., Chung Y. M., Lin Y. C., Hu H. C. and Wong W. W., 2007. Rifabutin-induced hypopyon uveitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome infected with *Mycobacterium avium* complex. *Journal of the Chinese Medical Association*, **70**, (3), 136-139.
- Wayne L. G., Good R. C., Tsang A., Butler R., Dawson D., Groothuis D., Gross W., Hawkins J., Kilburn J., Kubin M., Schröder K. H., Silcox V. A., Smith C., Thorel M. F., Woodley C. and Yakrus M. A., 1993. Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* : a cooperative study of the international working group on Mycobacterial taxonomy. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **43**, (3), 482-489.
- Yakrus M. A. and Good R. C., 1990. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, (5), 926-929.
- Yoder S., Argueta C., Holtzman A., Aronson T., Berlin O. G. W., Tomasek P., Glover N., Froman S. and Stelma G., 1999. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, (6), 2650-2653.

Table des matières

I / Sommaire du rapport

| | |
|--|----|
| Remerciements | 3 |
| Introduction..... | 4 |
| I / Etude bibliographique | 5 |
| I.1 / <i>Mycobacterium avium</i> | 5 |
| I.2 / Les Méthodes de typage des <i>Mycobacterium avium</i> | 18 |
| II / Matériels et Méthodes | 21 |
| II.1 / Situation expérimentale | 21 |
| II.2 / Procédure expérimentale..... | 22 |
| II.3 / Participants..... | 28 |
| II.4 / Traitement des résultats | 29 |
| III / Résultats et discussion | 30 |
| III.1 / Identification des sous-espèces par PCR..... | 30 |
| III.2 / Typages VNTR-MIRUs | 31 |
| III.3 / Typages RFLP | 42 |
| III.4 / Combinaison des Typages RFLP1311 et VNTR-MIRUs | 54 |
| IV / Conclusion | 57 |
| IV.1 / Identification des sous-espèces du MAC par PCR..... | 57 |
| IV.2 / Identification des sous-espèces du MAC par typage moléculaire..... | 57 |
| IV.3 / Etude épidémiologique des sous-espèces du MAC par typage moléculaire..... | 58 |
| V / Perspectives..... | 59 |
| V.1 / Les méthodes d'étude épidémiologique du MAC | 59 |
| V.2 / La méthode de typage VNTR-MIRUs..... | 59 |
| V.3 / Les méthodes de typage RFLP | 60 |
| V.4 / Intégration à l'étude de souches d'autres origines..... | 60 |
| Références bibliographiques..... | 61 |
| Table des matières | 66 |
| I / Sommaire du rapport | 66 |
| II / Sommaire des illustrations | 67 |
| III / Sommaire des annexes..... | 69 |
| Annexes | 1 |
| Glossaire | 12 |
| Abstract/Résumé..... | 13 |

II / Sommaire des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne..... | 5 |
| Figure 2 : Arbre phylogénétique des <i>Mycobacterium</i> à croissance rapide (a), à croissance lente caractérisés par une courte hélice 18 (b), et à croissance lente caractérisés par une longue hélice 18 (c) obtenus par séquençage de l'ADNr 16S, avec <i>M. tuberculosis</i> comme genre de comparaison | 6 |
| Figure 3 : Arbre phylogénétique de mycobactéries à croissance lente, basé sur le séquençage de l'ADNr 16S | 7 |
| Figure 4 : Distribution des différents éléments et séquences d'insertion chez <i>Mycobacterium avium</i> | 19 |
| Figure 5 : Répartition des 168 souches de <i>M. avium</i> typées par RFLP1245-1311 et VNTR-MIRUs sur 8 loci, et isolées de mammifères comme l'homme, les animaux sauvages et domestiques (a), d'oiseaux (b), ainsi que d'animaux d'élevage et d'environnement d'élevage (c) | 22 |
| Figure 6 : Cycle PCR de la polymérase Hot start utilisée pour amplifier les séquences d'insertion IS901 et IS1245 en vue de différencier les sous-espèces <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> et <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> | 24 |
| Figure 7 : Site de clivage par coupe franche de l'enzyme de restriction PvuII | 25 |
| Figure 8 : Dispositif du transfert actif sous vide (a, b et c) et du transfert passif par capillarité (d) | 25 |
| Figure 9 : Principe du système ECL de marquage et de détection de sonde de chez Amersham..... | 27 |
| Figure 10 : Cycle PCR de la polymérase Go taq utilisée pour amplifier les MIRUs des loci 292 et X3, ainsi que les VNTR des loci 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 des sous-espèces <i>M.avium</i> ssp. <i>avium</i> , <i>M.avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> et <i>M.avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> | 28 |
| Figure 11 : Recherche de la présence des éléments d'insertion IS1245 et IS901 pour différencier la sous-espèce <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> de la sous-espèce <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> | 30 |
| Figure 12 : Proportion des souches par origine, présentant une amplification de IS901 forte (a), faible (b) ou absente (c) comparativement à la souche <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> de référence ATCC 25291 | 30 |
| Figure 13 : Typologie des Répétitions en Tandem (TR) obtenues sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 au cours du typage VNTR-MIRUs de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> et <i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> selon la méthode développée sur <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007)..... | 32 |
| Figure 14 : Pouvoirs de discrimination des combinaisons successives des loci X3 ; 25 ; 47 ; 32 ; 292 ; 10 ; 3 et 7, présentant des indices de discrimination unitaires décroissant respectivement de 0,74 ; 0,64 ; 0,52 ; 0,49 ; 0,37 ; 0,27 ; 0,05 et 0,04 chez <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> , ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> | 33 |
| Figure 15 : Première partie du dendrogramme du typage par VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> , suivant le coefficient multi-états | 34 |
| Figure 16 : Deuxième partie du dendrogramme du typage par VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> , suivant le coefficient multi-états | 35 |
| Figure 17 : Troisième partie du dendrogramme du typage par VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> , suivant le coefficient multi-états | 36 |
| Figure 18 : Répartition du nombre de souches associées par profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007), en fonction de sous-espèces de <i>M. avium</i> identifiées par amplification PCR de IS901 | 38 |

| | |
|--|----|
| Figure 19 : Représentation en trois dimensions des distances génétiques existantes entre les profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007) chez <i>M. avium</i> ssp <i>avium</i> , <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> , <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> et <i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> | 40 |
| Figure 20 : Répartition du nombre de souches associées par profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007), en fonction de l'origine | 41 |
| Figure 21 : Observation de l'ADN génomique extrait avant normalisation de la concentration (a) et après la restriction enzymatique (b)..... | 42 |
| Figure 22 : Migration des fragments de restriction à une distance normalisée de 14,5cm entre les puits et le fragment à 1kb du marqueur de taille, permettant une comparaison inter-gels de profils RFLP1245-1311 | 43 |
| Figure 23 : Dendrogramme du typage par RFLP1245 de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> , suivant le coefficient de Dince à 2% d'optimisation et 2% de tolérance, et résultats du typage VNTR-MIRUs sur les loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32..... | 44 |
| Figure 24 : Première partie du dendrogramme du typage par RFLP1311 de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> , suivant le coefficient de Dince à 2% d'optimisation et 2% de tolérance , et résultats du typage VNTR-MIRUs sur les loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32..... | 48 |
| Figure 25 : Deuxième partie du dendrogramme du typage par RFLP1311 de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> , suivant le coefficient de Dince à 2% d'optimisation et 2% de tolérance, et résultats du typage VNTR-MIRUs sur les loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32..... | 49 |
| Figure 26 : Représentation en trois dimensions des distances génétiques existantes entre les combinaisons des profils RFLP1311 et VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007), en fonction de la sous-espèce de <i>M. avium</i> (a) et de l'origine de l'isolement des souches d'étude (b) | 54 |
| Figure 27 : Représentation selon cette étude des voies de contaminations probables, hypothétiques (?), majoritaires (flèches épaisses) et minoritaires (flèches minces) entre l'environnement, l'homme, le bovin, les mammifères sauvages et domestiques, l'oiseau, le porc et/ou le pigeon par <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> (bleu) ; <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> (vert) ; <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (violet) et/ou <i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> (jaune) | 56 |
| Tableau 1 : Profils VNTR-MIRUs obtenus sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 au cours du typage de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> et <i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> selon la méthode développée sur <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007)..... | 32 |
| Tableau 2 : Indices de discrimination (DI) des loci 292, X3, loci 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 analysés par typage VNTR-MIRUs de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; <i>M. avium</i> ssp. <i>hominissuis</i> et <i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i> | 33 |
| Tableau 3 : Profils VNTR-MIRUs identifiés sur les loci 292 ; X3 ; 25 ; 47 ; 3 ; 7 ; 10 et 32 (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007) chez <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> et <i>M. avium</i> autre que <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> par l'INRA de Tours et/ou l'Afssa de Maisons-alfort..... | 37 |

III / Sommaire des annexes

| | |
|--|----|
| Annexe 1 : Caractéristiques culturelles des mycobactéries selon la norme NF U 47-104 | 1 |
| Annexe 2 : Caractéristiques biochimiques des mycobactéries selon la norme NF U 47-104 | 1 |
| Annexe 3 : Caractéristiques biochimiques et culturelles des sous-espèces du complexe <i>Mycobacterium</i> | 2 |
| Annexe 4 : Microscopie électronique d'une culture de macrophages de la moelle osseuse de souris (MO), infectés par <i>Mycobacterium avium</i> | 3 |
| Annexe 5 : Œil d'un patient atteint d'uveïtis hypopyon..... | 4 |
| Annexe 6 : Radiographie d'un thorax de patient atteint de sarcoïdose pulmonaire | 4 |
| Annexe 7 : Front d'un patient atteint de sarcoïdose cutanée | 4 |
| Annexe 8 : Paratuberculose chez une chèvre (a) et un bovin (b), tuberculose aviaire responsable chez un faisand de lésions des intestins, de la rate (c) et du foie (d), et tuberculose aviaire responsable chez un porc de lésions de la plèvre (e), de la rate et du foie (f) | 5 |
| Annexe 9 : Composition de milieux de culture | 6 |
| Annexe 10 : Amorces de séquences amplifiées par PCR (synthétisées par MWG)..... | 7 |
| Annexe 11 : Répétitions en tandem polymorphes chez la souche de référence <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> K10 | 8 |
| Annexe 12 : Table de conversion des tailles d'amplicons obtenus (pb) en nombres de répétitions en tandem (TR) d'après les informations obtenues suite au développement de la méthode VNTR-MIRUs chez la souche de référence <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> K10 par l'INRA de Tours (Biet <i>et al.</i> 2005b; Thibault <i>et al.</i> 2007) | 9 |
| Annexe 13 : Première partie dendrogramme de la combinaison des résultats obtenus par typage RFLP1311 et VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> | 10 |
| Annexe 14 : Deuxième partie du dendrogramme de la combinaison des résultats obtenus par typage RFLP1311 et VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de <i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i> ; ssp. <i>hominissuis</i> et ssp. <i>silvaticum</i> | 11 |

Annexes

Annexe 1 : Caractéristiques culturales des mycobactéries selon la norme NF U 47-104

| Mycobactéries | pigment | | Température de croissance | | | Temps (j) | | PNB | TCH | GEL | Tb1 | EMB | PZA | Lev | Pyr | Myc |
|--------------------------------|---------|-----|---------------------------|------|------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | obs | lum | 30°C | 37°C | 42°C | <7 | >10 | | | | | | | | | |
| <i>M. tuberculosis</i> | - | - | V | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | nt | - | nt |
| <i>M. bovis</i> | - | - | V | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | nt | + | nt |
| <i>M. africanum</i> | - | - | - | + | - | - | + | - | V | - | V | - | - | nt | + | nt |
| <i>M. kansasii</i> | - | + | V | + | - | - | + | V | + | - | - | - | nt | nt | nt | nt |
| <i>M. marinum</i> | - | + | + | V | - | V | + | V | + | + | + | + | nt | nt | nt | nt |
| <i>M. goodii</i> | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | nt | - | nt | nt | nt | nt |
| <i>M. avium-intracellulare</i> | - | - | V | + | V | - | + | + | + | - | V | + | nt | nt | + | V |
| <i>M. terrae</i> | - | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | nt | nt | - | - |
| <i>M. paratuberculosis</i> | - | - | - | + | - | - | + | V | + | - | nt | + | nt | nt | + | + |
| <i>M. fortuitum</i> | - | - | + | + | V | + | + | + | + | + | + | nt | nt | + | nt | nt |
| <i>M. chelonae</i> | - | - | + | V | - | + | + | + | + | + | + | nt | nt | - | nt | nt |
| <i>M. vaccae</i> | + | + | + | + | - | + | + | nt | + | + | nt | nt | nt | nt | nt | nt |

+: positif ; - : négatif ; V : variable ; nt : non testé ; obs : obscurité ; lum : lumière ; PNB : p-nitrobenzoate ; Tb1 : thiosemicarbazone ; EMB : ethambutol ; TCH : hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique ; GEL : gélose ordinaire ; Lev : levulose comme unique source de carbone ; Pyr : pyruvate ; PZA : pyrazinamide ; Myc : mycobactine

Annexe 2 : Caractéristiques biochimiques des mycobactéries selon la norme NF U 47-104

| Mycobactéries | Caractéristiques biochimiques | | | | | | | | Acides mycoliques | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------------|-----|----------|----------|------|-----|-----|-----|-------------------|----|-----|----|---|----|
| | Nia | Nit | Cat 20°C | Cat 68°C | Urée | T80 | GLU | ARY | I | II | III | IV | V | VI |
| <i>M. tuberculosis</i> | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | - | - |
| <i>M. bovis</i> | - | - | + | - | + | - | - | - | + | - | + | + | - | - |
| <i>M. africanum</i> | V | V | + | - | V | V | V | - | + | - | + | + | - | - |
| <i>M. kansasii</i> | - | + | + | + | V | + | + | V | + | - | + | + | - | - |
| <i>M. marinum</i> | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | - | - |
| <i>M. goodii</i> | - | - | + | + | V | + | + | - | + | - | + | + | - | - |
| <i>M. avium-intracellulare</i> | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | + | - | + |
| <i>M. terrae</i> | - | + | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + |
| <i>M. paratuberculosis</i> | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | + | - | + |
| <i>M. fortuitum</i> | - | + | + | + | nt | nt | nt | + | + | + | - | - | + | - |
| <i>M. chelonae</i> | V | - | + | V | nt | nt | nt | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>M. vaccae</i> | - | - | + | + | nt | nt | nt | nt | + | + | - | + | - | - |

+: positif ; - : négatif ; V : variable ; nt : non testé ; Nia : production de niacine ; Nit : nitrate réductase ; Cat : catalase ; T80: hydrolyse du tween 80 à 10j ; GLU: glucosidase ; ARY : arylsulfatase à 3j

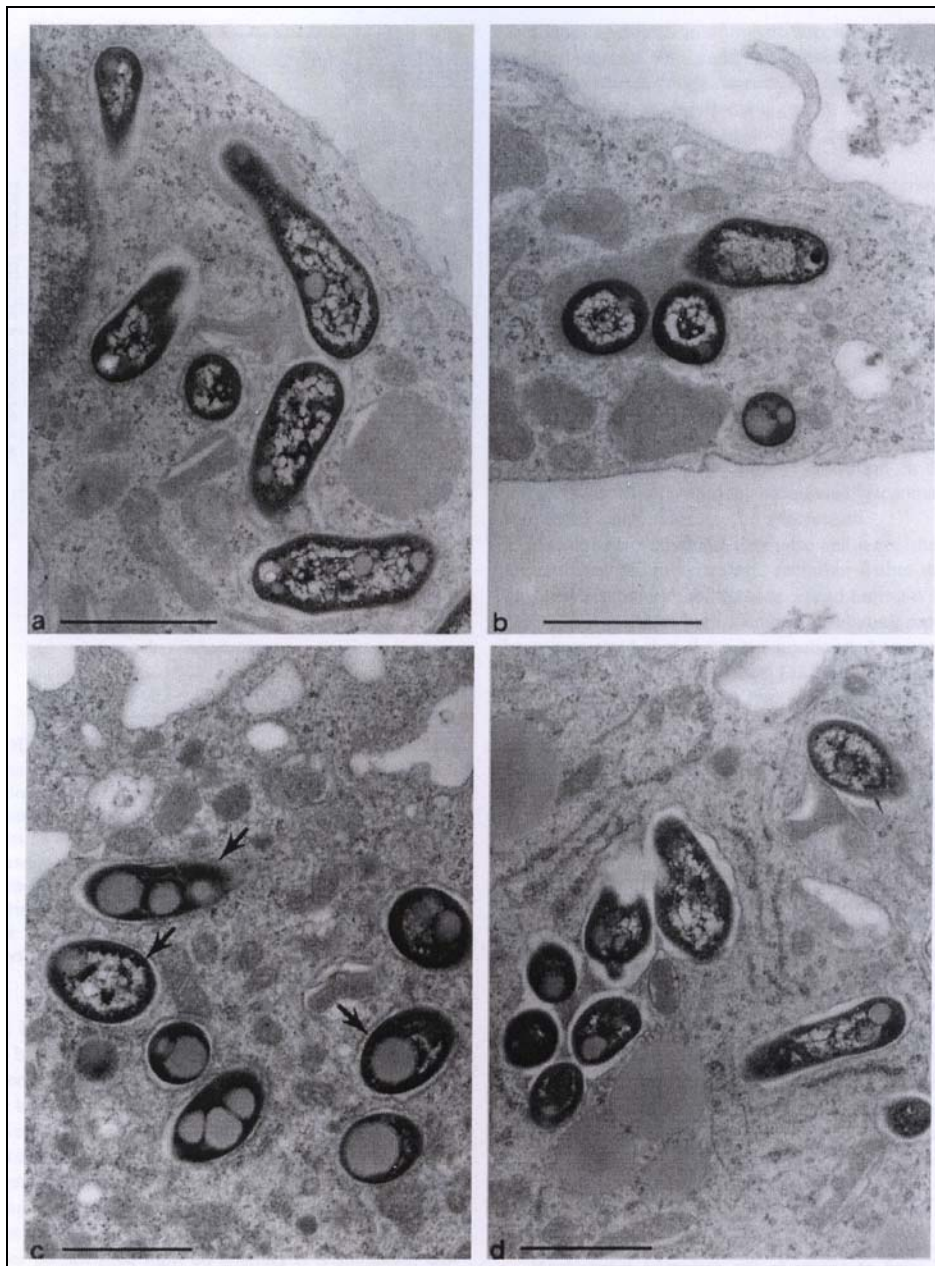
Annexe 3 : Caractéristiques biochimiques et culturelles des sous-espèces du complexe *Mycobacterium avium*

| Caractéristique | <i>ssp. avium et hominissuis</i> | <i>ssp. paratuberculosis</i> | <i>ssp. silvaticum</i> |
|--|----------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Croissance à +42°C | ± | + | + |
| Croissance à +37°C | + | + | + |
| Croissance à +30°C | - | ND | ND |
| Stimulation par le pyruvate | ± | + | - |
| Mycobactine requise pour la croissance | - | + | +* |
| Croissance sur milieu à base d'œuf | - | + | - |
| Tolérance à 5% NaCl | - | - | - |
| Catalase +68°C | + | + | + |
| Hydrolyse du Tween 80 | - | - | - |
| Niacine | - | - | - |
| Croissance en présence de : | | | |
| D-cyclosérine (30µg/ml) | + | + | + |
| D-cyclosérine (50µg/ml) | - | + | - |
| éthambutol (7,5µg/ml) | + | + | + |
| pyrazinamide (50µg/ml) | + | + | + |
| rifampicine (1µg/ml) | + | + | - |
| ansamycine (1µg/ml) | ± | + | - |
| streptomycine (30µg/ml) | + | + | + |

ND : non déterminé ; + : positif ; - : négatif ; ± : variable

(Legrand *et al.* 2000), * information de l'UZB du LERAZ de l'Afssa de Maisons-alfort

Annexe 4 : Microscopie électronique d'une culture de macrophages de la moelle osseuse de souris (MO), infectés par *Mycobacterium avium*



(Schaible *et al.* 1998)

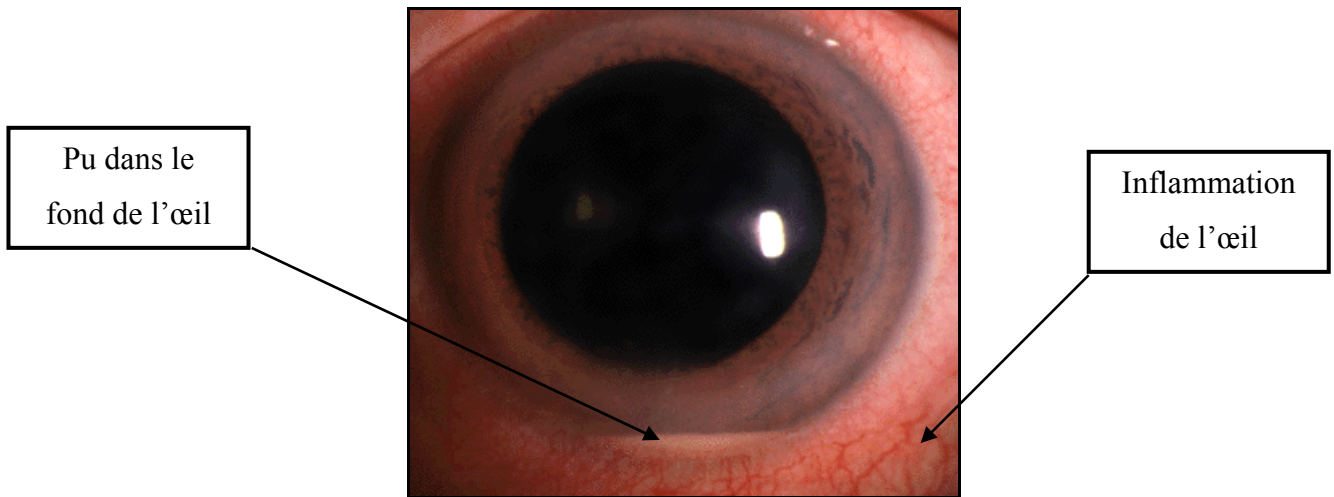
a : latence du MO 2h suivant l'infection : séquestration des bacilles dans des vacuoles individuelles

b : activation du MO 2h après l'infection : fusion de lysosomes avec les vacuoles séquestrantes

c : latence du MO jusqu'à 5j après infection : les bacilles résistent et se multiplient dans les vacuoles individuelles ; et forte production de ribosomes par l'hôte

d : activation du MO 5j après infection : faible dégénérescence des bacilles présent dans les vacuoles ; et faible production de ribosomes par l'hôte

Annexe 5 : Œil d'un patient atteint d'uveïtis hypopyon



Uvéite : inflammation intraoculaire ; Hypopyon : accumulation de pu dans le fond de l'œil

<http://medweb.bham.ac.uk/easdec/eyetextbook/Uveitis/uveitis.htm>

Annexe 6 : Radiographie d'un thorax de patient atteint de sarcoïdose pulmonaire



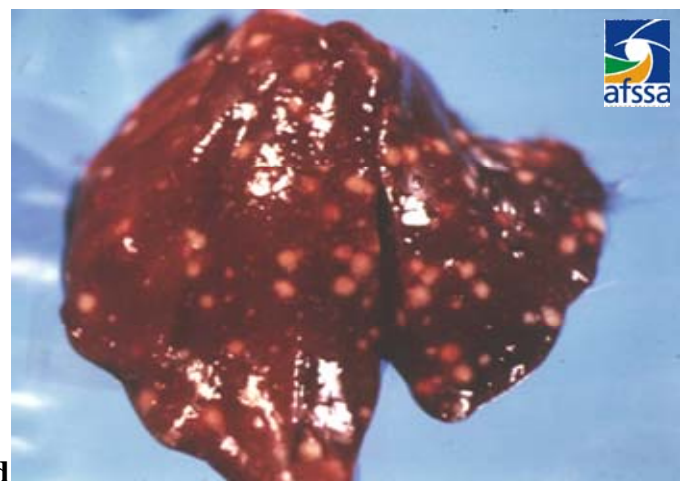
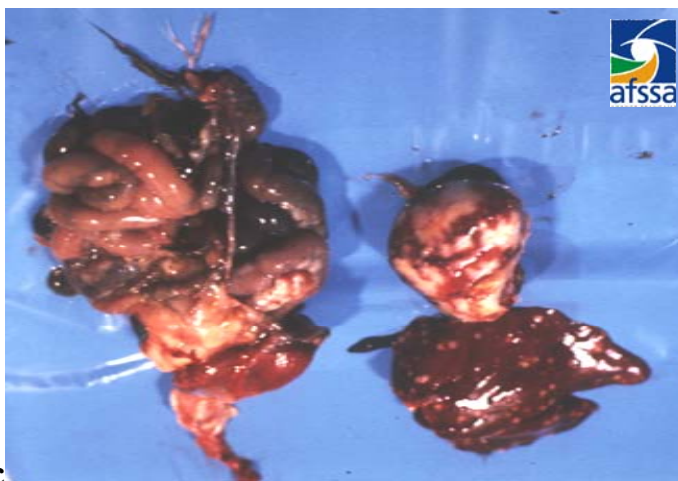
http://cofer.univ-lille2.fr/2eme_cycle/items/item_124.htm

Annexe 7 : Front d'un patient atteint de sarcoïdose cutanée



http://www.anaisdedermatologia.org.br/figura.php?figura_id=766

Annexe 8 : Paratuberculose chez une chèvre (a) et un bovin (b), tuberculose aviaire responsable chez un faisant de lésions des intestins, de la rate (c) et du foie (d), et tuberculose aviaire responsable chez un porc de lésions de la plèvre (e), de la rate et du foie (f)



Annexe 9 : Composition de milieux de culture

| Middlebrook 7H9 non supplémenté | |
|--|---------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 1l |
| Eau ultra pure | 900ml |
| Tween 80 | 0,6ml |
| Middlebrook 7H9 | 4,7g |
| Mycobactine | 2mg |
| Ethanol absolu | 4ml |
| Composants après stérilisation | Quantité qsp 200ml |
| Albumine, Dextrose, Catalase | 20ml |

| Middlebrook 7H9 supplémenté | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 1l |
| Eau ultra pure | 900ml |
| Tween 80 | 0,6ml |
| Middlebrook 7H9 | 4,7g |
| Composants après stérilisation | Quantité qsp 200ml |
| Albumine, Dextrose, Catalase | 20ml |

| Löwenstein-Jensen | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 600ml |
| Phosphate monopotassique | 2,40g |
| Sulfate de magnésium | 0,24g |
| Citrate de magnésium | 0,60g |
| L-asparagine anhydre | 3,60g |

| Löwenstein-Jensen (suite) | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 600ml |
| Fécule de pomme de terre | 30g |
| Vert malachite | 0,4g |
| Glycérole | 12ml |

| Coletsos | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 600ml |
| Phosphate monopotassique | 2,40g |
| Sulfate de magnésium | 0,24g |
| Citrate de magnésium | 0,60g |
| L-asparagine anhydre | 3,60g |
| Pyruvate de sodium | 1,60g |
| Glutamate de sodium | 1,10g |

| Coletsos (suite) | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 600ml |
| Fécule de pomme de terre | 16g |
| Poudre d'anthracite | 0,16g |
| Solution d'oligoéléments | 1,6ml |
| Bleu de tournesol | 0,40g |
| Vert malachite | 0,4g |
| Glycérine bidistillée | 12ml |

| Solution d'oligoéléments pour Coletsos | |
|---|------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 1l |
| MnSO ₄ , 7H ₂ O | 2g |
| CaSO ₄ , 2H ₂ O | 0,50g |
| NiCl ₂ , 6H ₂ O | 0,05g |
| COCl ₂ , H ₂ O | 0,05g |
| Ti ₂ (SO ₄) ₂ | 0,20g |

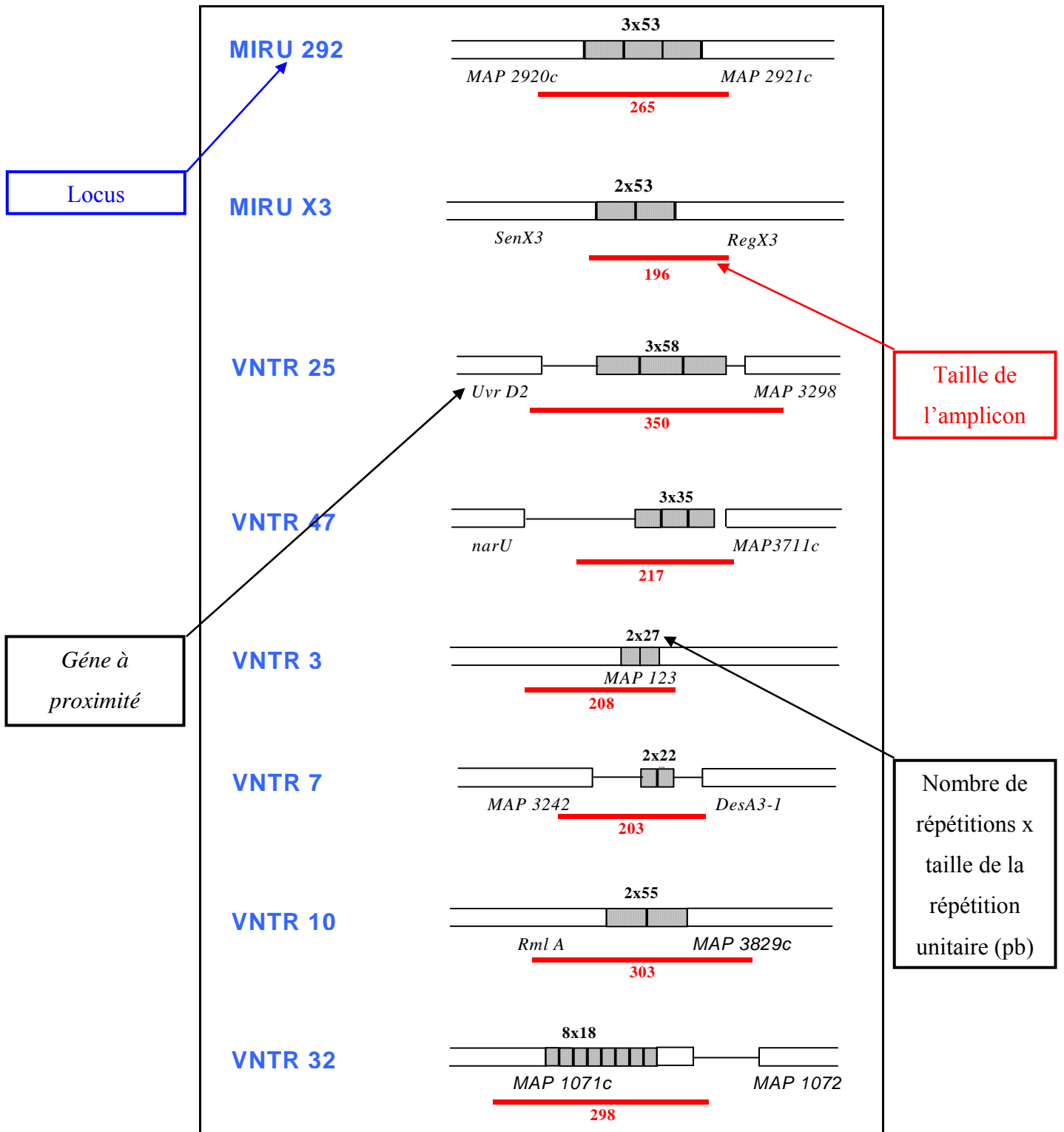
| Solution d'oligoéléments pour Coletsos (suite) | |
|---|------------------------|
| Composants avant stérilisation | Quantité qsp 1l |
| ZnSO ₄ , 7H ₂ O | 0,10g |
| CuSO ₄ | 0,05g |
| GI ₂ SO ₄ , 4H ₂ O | 0,10ml |
| H ₃ BO ₃ | 0,05g |
| H ₂ SO ₄ 66 B | 1,0g |

Annexe 10 : Amorces de séquences amplifiées par PCR (synthétisées par MWG)

| Séquence de répétition en tandem | | Séquence d'insertion | | Amorces | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|---|--|-------------------------------|--|--|
| | | | | | | |
| IS/245 (courte) (175pb) | IS 901 (1108pb) | GCAACGGTTTGTCTTGAAA | TGATACGGCCGGAATCGCGT | (Pavlik <i>et al.</i> 2000) | | |
| | IS 1311 (198pb) | P41 GGTGAGCGGATCCTCAAG P37 GCTGGACGCATTACGCCAATG | P40 GAATCCGCAGTTCAGGTC P38 CGCAACTCCAATCGCCAG | (Johansen <i>et al.</i> 2005) | | |
| MIRU 292 (53pb/répétition) | 292U ACTGGACGAGTTGGATGAGGAGGCCGCC | 292L TACGAGCTGCTCAAGCTGGCGG | | | | |
| MIRU X3 (53pb/répétition) | X3U AACCGAGAGAAGAACTAAGCCG | X3L CCCGCTGGCCTTCCCTGCTCCGTAA | | | | |
| VNTR 25 (58pb/répétition) | 25U GTC AAGGATCGGCCGAGG | 25L TGGACTRGAGCAGGTCAT | | | | |
| VNTR 47 (35pb/répétition) | 47U CGTTGGCATTCTGGCTAGC | 47L GGTGATGGTGTGTCATCC | (Biet <i>et al.</i> 2005b) | | | |
| VNTR 3 (27pb/répétition) | 3U CATATCTGGCATGGCTCCAG | 3L ATCGTGTGACCCCAAGAAT | (Thibault <i>et al.</i> 2007) | | | |
| VNTR 7 (22pb/répétition) | 7U GACAACGAAACCTACCTCGTC | 7L GTGAGCTGGCGGCTAAC | | | | |
| VNTR 10 (55pb/répétition) | 10U GAGGAGCAGCTGTCCGAG | 10L GAGAGCGTGGCCATCGAG | | | | |
| VNTR 32 (18pb/répétition) | 32U CCACAGGGTTTTGGTGAAG | 32L GGAATCCAACAGCAAGGAC | | | | |

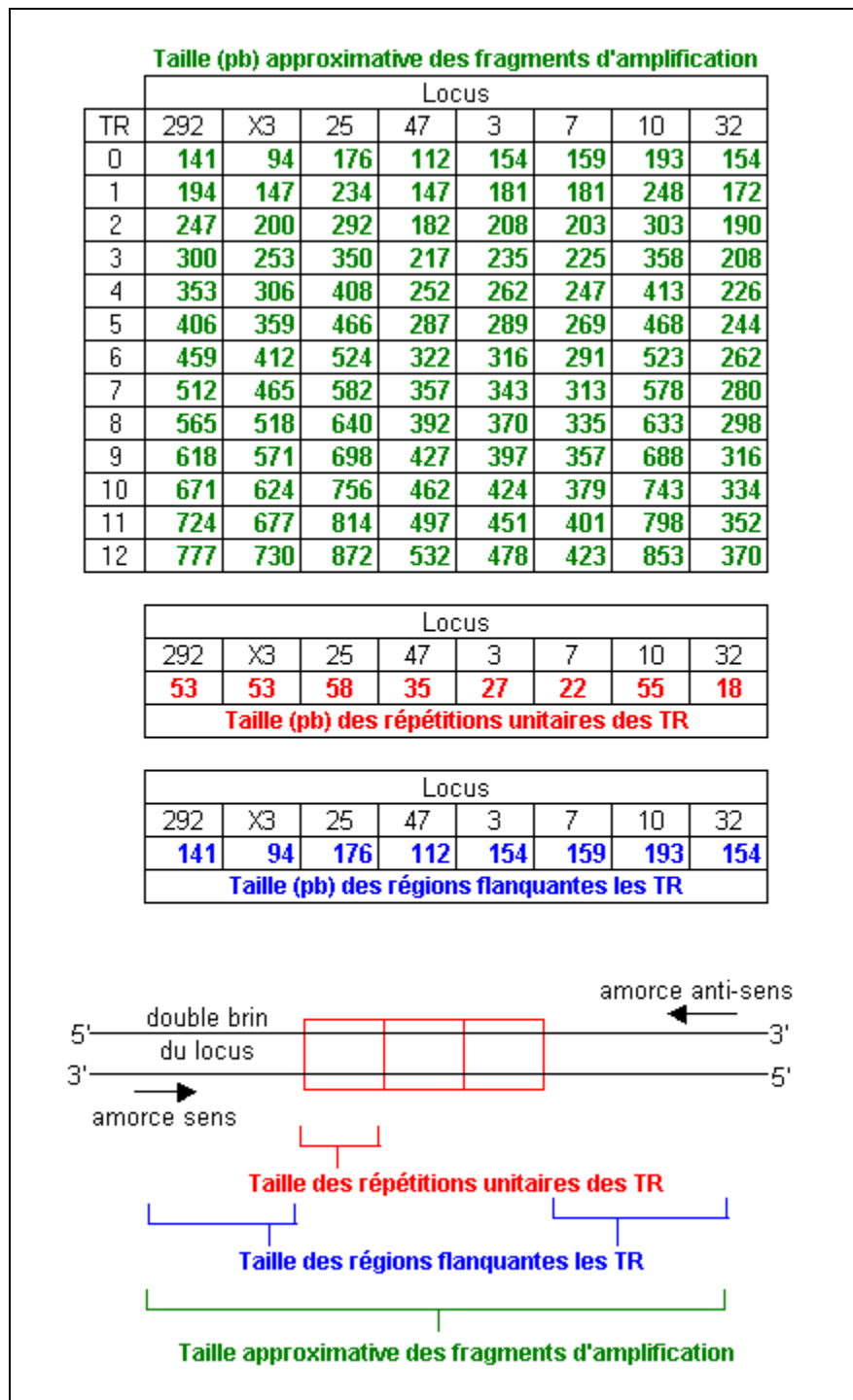
Annexe 11 : Répétitions en tandem polymorphes chez la souche de référence

M. avium ssp. *paratuberculosis* K10



(Thèse en cours de Virginie Thibault de l'INRA de Tours)

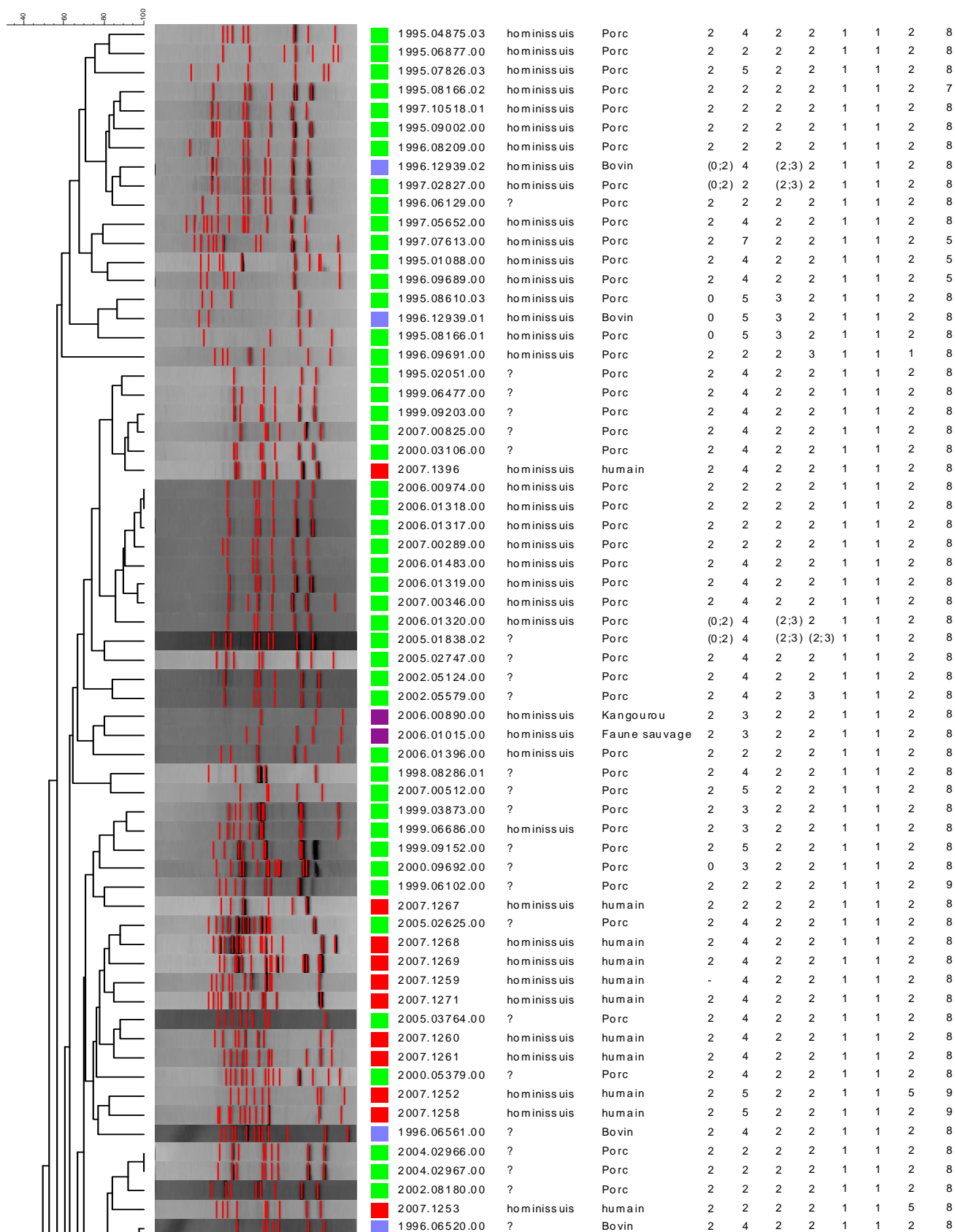
Annexe 12 : Table de conversion des tailles d'amplicons obtenus (pb) en nombres de répétitions en tandem (TR) d'après les informations obtenues suite au développement de la méthode VNTR-MIRUs chez la souche de référence *M. avium* ssp. *paratuberculosis* K10 par l'INRA de Tours (Biet *et al.* 2005b; Thibault *et al.* 2007)



NB : Les tailles des amplicons ne représentent que des possibilités et non pas des résultats empiriques et la table a été utilisée pour l'application à *M. avium* ssp. *avium* ; *M. avium* ssp. *hominissuis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*

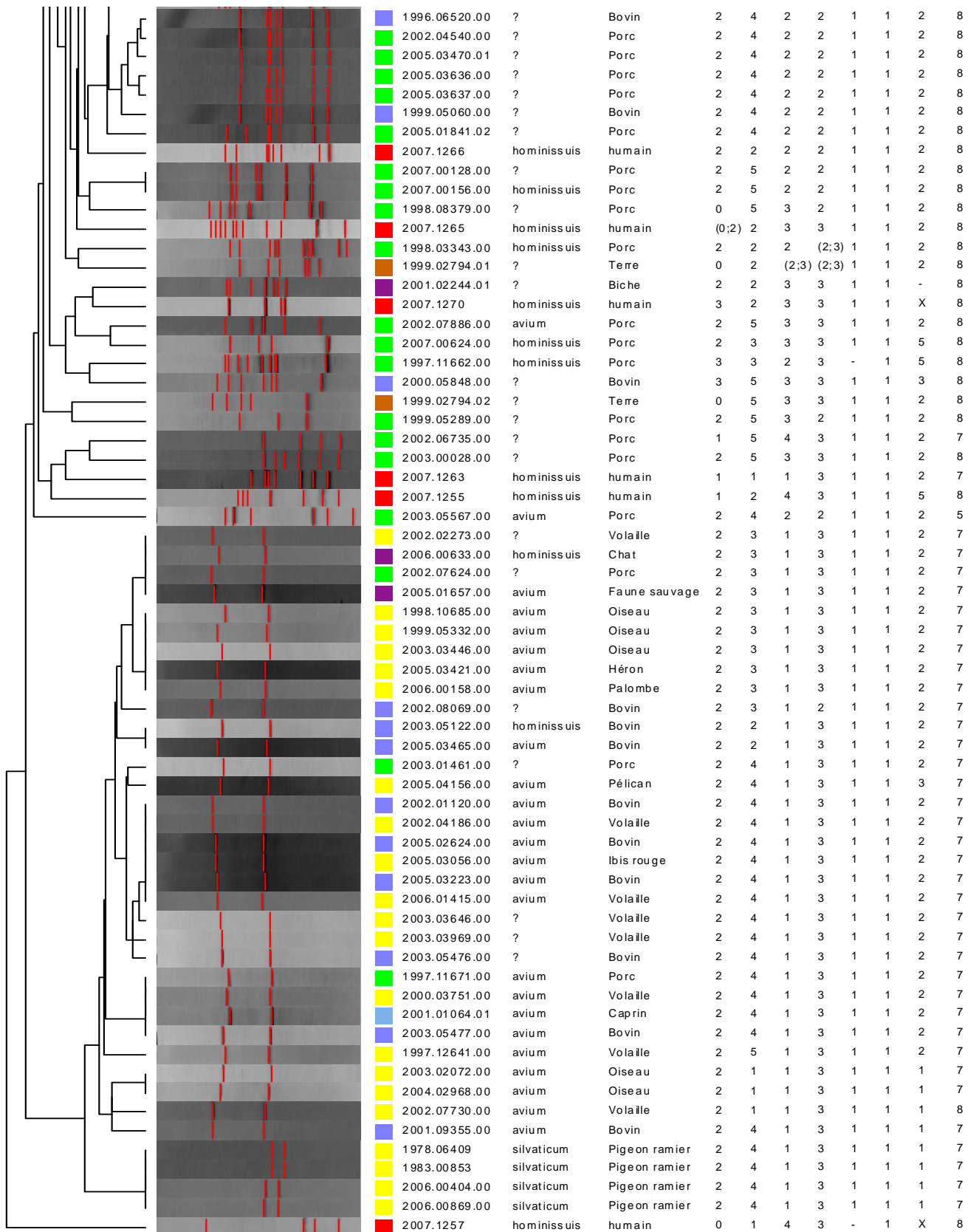
**Annexe 13 : Première partie dendrogramme de la combinaison des résultats obtenus par typage
RFLP1311 et VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de *M. avium* ssp. *avium* ;
ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum***

humain, porc, bovin, environnement d'élevage, oiseau, faune sauvage et domestique



**Annexe 14 : Deuxième partie du dendrogramme de la combinaison des résultats obtenus par typage
RFLP1311 et VNTR-MIRUs (loci 292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 et 32) de *M. avium* ssp. *avium* ;
ssp. *hominissuis* et ssp. *silvaticum***

humain, porc, bovin, environnement d'élevage, oiseau, faune sauvage et domestique



Glossaire

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
ATCC : Agence American Type Culture Collection
BET : Bromure d’Ethidium
BSA : Sérum Albumine Bovine
CNR : Centre National de Référence
CTAB : Bromure d’HexadécylTriméthylAmmonium
DI : Discrimination Index
dNTPs : Di-Nucléotide Tri-Phosphate
ETZ : Electron-Translucent Zone
HbhA : Heparin-Binding Hemagglutinin
HIV : Human Immune Virus
INRA : Institut Nationale de Recherche Agronomique
LAM : Lipoarabinomannan
LB : Loading Buffer
LERQAP : Laboratoire d’Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés
LERPAZ : Laboratoire d’Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses
MAC : Mycobacterium avium Complex
MIC : Mycobacterium intracellulare Complex
MIRUs : Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
MTC : Mycobacterium tuberculosis Complex
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS : Sodium Dodecyl Sulphate
SIDA : Syndrome d’ImmunoDéficiency Acquis
SmT : Smooth, flat and Transparent
SmD : Smooth, Domed and opaque
TBE : Tris-Borate-EDTA : Tris-Borate-Acide EthylèneDiamine-Tétracétique
TE : Tris-EDTA : Tris-Acide EthylèneDiamine-Tétracétique
TR : Tandem Repeats
UPGMA : Unweighted Pair Group Matching by An. Arithmetic Averages Algorithm)
US-EPA : U.S. Environment Protection Agency
**VENoMYC : Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and
Epidemiology of Mycobacterial diseases**
VNTR : Variable Number of Tandem Repeats
WHO : World Health Organization

Abstract/Résumé

Key words: *Mycobacterium*; PCR901-1245; RFLP1245-1311; VNTR-MIRUs

In order to obtain my Master Degree in Public Health, specializing in Quality and Food Safety at the Institute of Health Engineering in Lille (ILIS: Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé) I have gone through a 6-month training at the Bacterial Zoonoses Unit within the Laboratory of Study and Research of Animal Pathologies and Zoonoses (LERPAZ) at the French Food Safety Agency (Afssa) in Maisons-Alfort. The subject of the training is the study of genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies of human and animal origin using Restriction Fragments Length Polymorphism on insertion sequences IS1245-1311 (RFLP1245-1311) and Variable Number of Tandem Repeats-Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (VNTR-MIRUs).

Mycobacterium avium subsp *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* are harmful emergent bacterial species belonging to the *Mycobacterium avium* complex (MAC). These two subspecies are responsible of different pathologies in multiple animal species like birds, pigs, cattle, deer, sheep, goats, horses, cats, dogs, etc. Moreover, *Mycobacterium avium* subspecies have been isolated in Human Infectious Virus infected patients or in immuno-competent patients with pulmonary pathologies. Indeed, MAC is a ubiquitous bacterial group that can be found in water, in the environment or even in food. The Bacterial Zoonoses Unit (LERPAZ – Afssa, Maisons-Alfort) has dealt with animal mycobacterioses for many years. Dr Boschirolì's working group, with whom I have worked, has undertaken a molecular typing study in order to improve the taxonomic and epidemiological knowledge of MAC. Different strains of *Mycobacterium avium* subsp *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and also of *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* isolated from animals, humans, and the environment of Afssa's strain collection (collection of aprox. 160 strains) will be typed by two methods: RFLP1245-1311, which is the standard method to characterise MAC and VNTR characterisation, which has been developed in collaboration with National Institute of Agronomic Research in Tours (INRA: Institut National de Recherche Agronomique) in the last years. This last method has been mainly developed for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-the fourth member of MAC. The purpose of the training is to apply this method to other members of MAC. Besides this, my training has been organised in order to learn both techniques already performed at the INRA and to immediately put them into practice in the Afssa laboratory, aiming at comparing both methods and at studying the genetic diversity of MAC.

This training has enabled me to see how the Bacterial Zoonoses Unit is integrated to the LERPAZ. I could also work in another laboratory, this time at the INRA in Tours, through the VenoMYC European inter-laboratories exchange program. Besides, the methods used during this training, have given me the opportunity to work in applied research in molecular biology laboratories and in a biosafety-level-3 laboratory. This training period has been fulfilling to me, particularly as far as applied work in microbiology and biotechnology is concerned; these two fields being basic elements of my professional project.

Dans l'objectif d'obtenir mon Master 2 en Santé Publique spécialité Qualité et Sécurité Alimentaire à l'Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé (ILIS), j'ai réalisé un stage de 6 mois dans l'Unité de Zoonoses Bactériennes (UZB) du Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (LERPAZ) de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) à Maisons-alfort. Le sujet de ce stage fut l'étude de la diversité génétique de *Mycobacterium avium* ssp. d'origine humaine et animale par typage moléculaire RFLP1245-1311 (Restriction Fragments Length Polymorphism) et VNTR-MIRUs (Variable Number of Tandem Repeats-Mycobacterial Interspersed Repetitive Units).

Mycobacterium avium ssp. *avium* and *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis* sont des bactéries pathogènes émergentes appartenant au complexe MAC (*Mycobacterium avium* complex). Ces deux sous-espèces sont responsables de différentes pathologies chez de multiples animaux comme les cochons, le bétail, les cerfs, les moutons, les chèvres, les chevaux, les chats, les chiens... De plus, des *Mycobacterium avium* ssp. ont été isolées de l'homme HIV+ (Human Infectious Virus) ou de patients immunocompétents présentant des pathologies respiratoires. En effet, le MAC est un groupe de bactéries ubiquitaires, qui peuvent être isolées de l'eau, de l'environnement, ou même d'aliments. L'UZB travaille sur les mycobactérioses animales depuis plusieurs années, et le groupe de travail du Dr Boschirolì, avec qui j'ai travaillé, a donc entrepris une étude de caractérisation moléculaire dans l'objectif d'améliorer la taxonomie et les connaissances épidémiologiques du MAC. Différentes souches de *Mycobacterium avium* ssp *avium*, *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis*, mais aussi *M. avium* ssp. *silvaticum*, isolées de l'animal, de l'homme et de l'environnement (collection de l'Afssa : approximativement 160 souches), ont été caractérisées par RFLP1245-1311, qui est la méthode de référence pour caractériser le MAC, et par VNTR ; méthode qui a été développée ces dernières années en collaboration avec l'Institut Nationale de Recherche Agronomique (INRA) de Tours. Cette dernière méthode a été principalement développée sur *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ; la quatrième sous-espèce du MAC. L'objectif de ce stage a donc été d'appliquer cette méthode aux autres membres du MAC. Pour se faire, mon temps a été organisé pour apprendre ces deux techniques à l'INRA de Tours, et par la suite pour les mettre en pratique à l'Afssa de Maisons-alfort, afin de comparer les deux méthodes et d'étudier la diversité génétique du MAC.

Ce stage m'a permis de visualiser comment l'UZB est intégré au LERPAZ. J'ai pu aussi travailler dans un autre laboratoire ; l'INRA de Tours ; grâce au programme européen d'échange inter-laboratoire VenoMYC. Par ailleurs, les méthodes utilisées durant ce stage, m'ont permis de continuer à travailler en recherche appliquée dans des laboratoires de biologie moléculaire et dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Cette période de stage a été très enrichissante pour moi, particulièrement en microbiologie et en biotechnologie, deux domaines intégrant mon projet professionnel.

