

# Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* : marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces.

E. Legrand, C. Sola & N. Rastogi

Unité tuberculose & mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, Morne Jolivière, BP 484, F-97165 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe.  
Tél : 00 590 89 76 61. Fax: 00 590 89 38 80. E-mail : rastogi@ipagua.gp

Manuscrit n°2155/RIP 7. 3e colloque du réseau international des Instituts Pasteur et instituts associés. 14-15 octobre 1999, Institut Pasteur de Paris.

**Summary:** *Mycobacterium avium intracellulare* complex: phenotypic and genotypic markers and molecular basis of inter-species transmission.

The *Mycobacterium avium* complex (MAC) comprises a heterogeneous group of slowly-growing mycobacteria that are pathogenic for both humans and animals. Two genetically distinct species within MAC are *M. avium*, which tends to infect HIV-infected patients, and *M. intracellulare* more common among immunocompetent individuals. Contrary to *M. intracellulare* which relates to a single species, *M. avium* is separated into three subspecies: *M. avium* subsp. *avium*, a major opportunistic pathogen leading to a disseminated disease among terminal AIDS patients; *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, causing JOHNE's disease among ruminants and implicated in CROHN's disease among humans; and *M. avium* subsp. *silvaticum*, a pathogen affecting birds that may cause chronic enteritis among calves but has not yet been associated with human disease. With the exception of mycobactin-dependent growth of *M. paratuberculosis*, most of the biochemical and cultural tests cannot discriminate among the three subspecies of *M. avium*. However, recently developed molecular methods and fingerprinting of strains using insertion sequences allows not only to distinguish among them but also further to explore the polymorphism of human and animal isolates. Numerous studies have underlined the probable role of various ecological niches (water, dust, soil, pigs, poultry and ruminants etc.) as a possible source of contamination for AIDS patients. This paper reviews the phenotypic and genotypic markers and epidemiology of *M. avium* complex organisms and current knowledge of the molecular basis of inter-species transmission.

**Résumé :**

Le complexe *Mycobacterium avium* (MAC) est un groupe hétérogène de mycobactéries à croissance lente comprenant des pathogènes de l'homme et de l'animal. Ce complexe comprend deux espèces génétiquement distinctes *M. avium* et *M. intracellulare*. Contrairement à *M. avium*, *M. intracellulare* infecte surtout les patients immunocompétents. Quant à *M. avium*, elle comprend trois sous-espèces correspondant à des caractéristiques de pathogénicité et d'hôte: il s'agit de *M. avium* subsp. *avium*, essentiellement un pathogène opportuniste chez les patients atteints de sida où il est responsable d'infections disséminées; *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, agent responsable de la maladie de JOHNE chez les ruminants et probablement associé à la maladie de CROHN chez les humains; et *M. avium* subsp. *silvaticum*, un pathogène aviaire qui peut causer l'entérite chronique chez les veaux mais n'a pas encore été associé à une maladie chez l'homme. Les caractéristiques biochimiques et culturelles de ces espèces étant assez similaires (hormis la dépendance à la mycobactine de *M. paratuberculosis*), il est difficile de les séparer par les tests classiques. Toutefois de nombreuses méthodes moléculaires et études des séquences d'insertion permettent aujourd'hui de différencier les espèces et sous-espèces de MAC et soulignent une certaine diversité au niveau du polymorphisme chez les isolats humains et animaux. Plusieurs études mettent en évidence le rôle de nombreuses niches écologiques (eau, sol, poussières, porcins, volailles, ovins etc.) comme source potentielle de contamination des patients sidéens. Dans cette revue, nous décrivons les différents marqueurs phénotypiques et génotypiques et l'épidémiologie du complexe *M. avium*, ainsi que les connaissances actuelles concernant les bases moléculaires de la transmission inter-espèces.

*Mycobacterium avium*  
*Mycobacterium paratuberculosis*  
*Mycobacterium silvaticum*  
*Mycobacterium intracellulare*  
transmission  
RFLP  
fingerprinting  
IS1245  
PFGE  
taxonomy

*Mycobacterium avium*  
*Mycobacterium paratuberculosis*  
*Mycobacterium silvaticum*  
*Mycobacterium intracellulare*  
transmission  
RFLP  
empreintes génomiques  
IS1245  
électrophorèse en champ pulsé  
taxonomie

## Introduction

Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) est un groupe hétérogène de bacilles ubiquitaires saprophytes à croissance lente et comprenant des espèces pathogènes

opportunistes pour l'homme et l'animal, naturellement résistantes à de nombreux traitements antimycobactériens classiques. L'épidémiologie des infections animales ou humaines liées à ces mycobactéries est extrêmement mal connue et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces le sont

encore moins. Ces mycobactéries qui, comme on le verra, ont fait l'objet d'études à caractère fondamental depuis de nombreuses années, sont devenues d'un intérêt médical majeur avec l'avènement de l'épidémie de sida et la découverte de leur omniprésence dans l'environnement. Par ailleurs, compte tenu de l'importance croissante des problèmes de sécurité alimentaire, du rôle connu de certaines mycobactéries atypiques dans certaines pathologies du bétail et compte tenu de la méconnaissance des mécanismes de passage de ces infections à l'homme, les mycobactéries atypiques, notamment le complexe *M. avium-intracellulare* (MAC), font actuellement l'objet d'investigations qui visent à mieux définir l'épidémiologie de ces infections chez l'homme et chez l'animal ainsi que la nature des mécanismes de virulence liés à ce groupe.

Dans cette revue, nous essayerons de faire le point sur l'avancement des recherches dans ce domaine. Après un rappel sur des travaux antérieurs qui ont permis de mieux définir ce groupe de mycobactéries, nous verrons comment les méthodes de diagnostic moléculaire récemment développées améliorent notre compréhension du complexe MAC du point de vue taxonomique. Puis, après avoir présenté la problématique et les méthodes d'étude de l'épidémiologie des infections à *M. avium*, nous ferons le point sur les études de diversité génotypique et de distribution géographique de ces mycobactéries en cours, en liaison avec les pathologies humaines ou animales rencontrées, afin de tenter d'établir des liens épidémiologiques ou de définir des réservoirs naturels des infections par MAC. Enfin, nous envisagerons succinctement quelles sont les perspectives de recherche dans ce domaine.

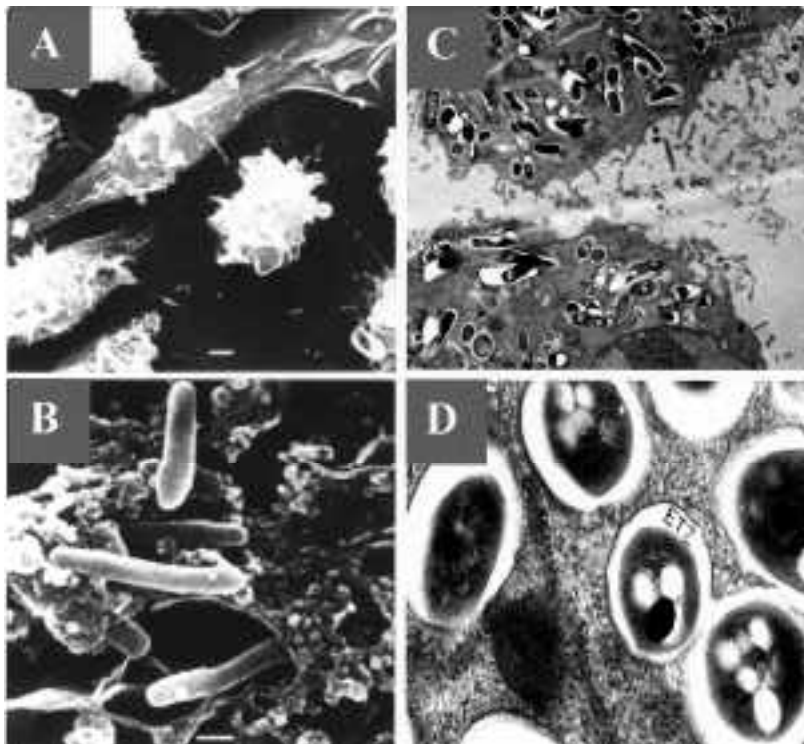
## Rappels de travaux antérieurs sur le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare*

### Définitions

Les mycobactéries dites atypiques sont définies, par opposition à *Mycobacterium tuberculosis*, bacille responsable de la tuberculose humaine, comme des mycobactéries autres que *Mycobacterium tuberculosis* (MAMT), ou encore rencontrées sous le terme de MOTT (*Mycobacteria other than tuberculosis*) dans la littérature anglo-saxonne. Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* comprend deux espèces génétiquement distinctes, *M. avium* et *M. intracellulare*. *M. avium*, agent de la tuberculose aviaire, est un agent pathogène opportuniste chez les patients atteints de sida où il provoque des infections disséminées (46, 50). Grâce à l'avènement de la trithérapie antirétrovirale, on a récemment assisté à une importante régression de la prévalence de ces infections dans les pays industrialisés. En revanche, dans les pays en voie de développement où ces trithérapies sont encore peu utilisées, les infections par MAC demeurent nombreuses. Comme on le verra plus loin, il existe actuellement au sein de l'espèce *M. avium* trois sous-espèces d'intérêt épidémiologique différent : *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* ssp. *silvaticum*. Par ailleurs, *M. intracellulare* est responsable quant à lui d'infections pulmonaires et d'adénites cer-

Figure 1.

Observation au microscope électronique de macrophages murins (lignée J774) infectés par *M. avium* et *M. paratuberculosis*.  
Electron microscopy of murine macrophages (J774 cell line) infected by *M. avium* and *M. paratuberculosis*.



Observation par microscopie à balayage de macrophages infectés par *M. avium* après 4 h (A) et 7 jours d'infection (B) ; dans ce dernier cas, on peut observer la lyse des cellules provoquée par une augmentation de la charge bacillaire et la libération des bactéries dans le milieu extracellulaire. La microscopie à transmission de macrophages infectés par *M. paratuberculosis* après 2 jours (C) et 4 jours (D) d'infection démontre que la plupart des bactéries phagocytées se trouvent à l'intérieur des phagosomes avec une forte inhibition des fusions phagosomes-lysosomes. De plus, les bactéries sont entourées par une structure capsulaire appelée l'ETZ (electron-transparent zone) qui ne permet pas un contact direct entre la surface bactérienne et la membrane du phagosome ou du phago-lysosome.

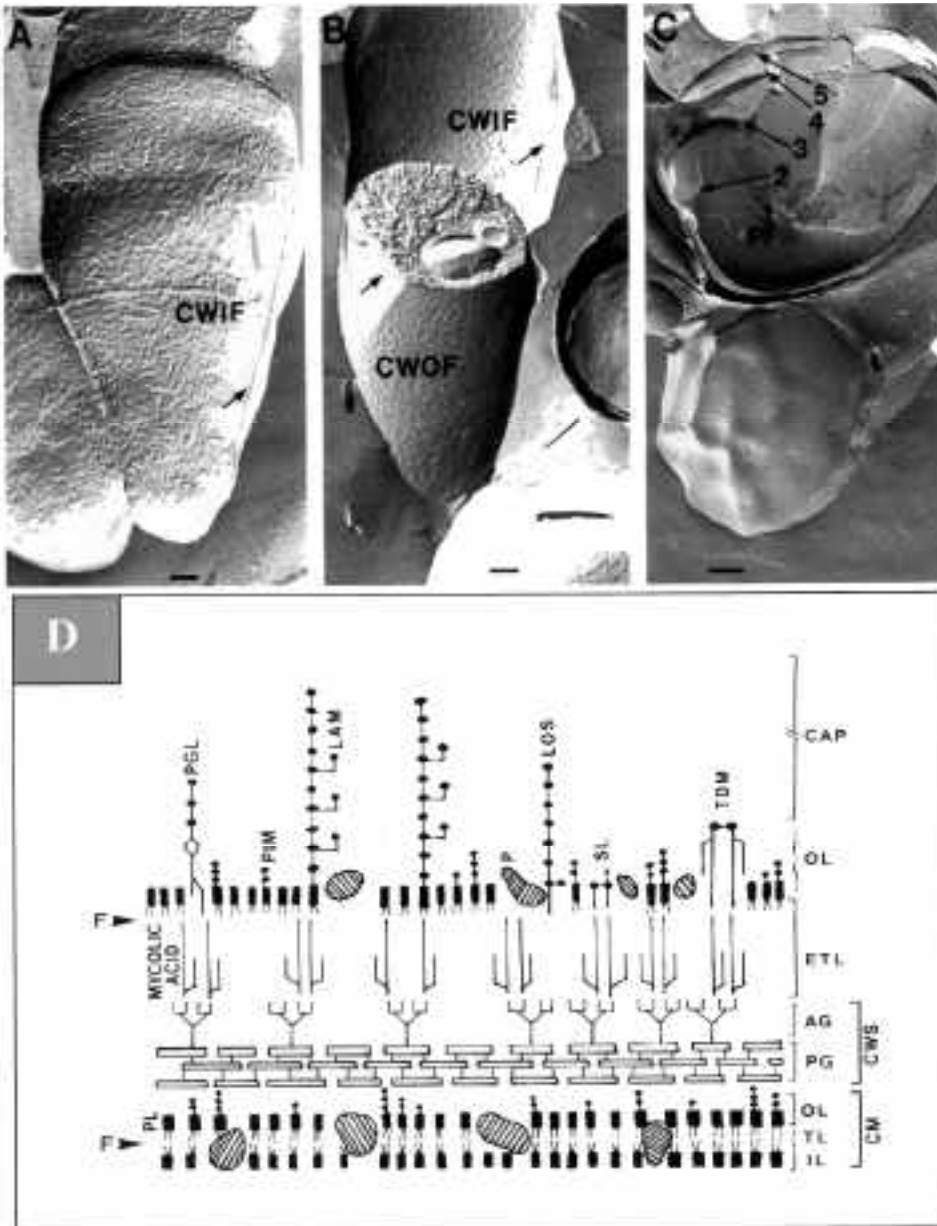
vicales chez l'homme et n'est pas majoritairement retrouvé chez les patients sidéens. Cette différence épidémiologique majeure entre deux espèces pathogènes opportunistes longtemps confondues pose donc le problème de la compréhension de la pathogenèse de ces infections.

### Historique du modèle *M. avium*

Même si l'espèce *M. avium* a été décrite il y a longtemps, les travaux à caractère moléculaire ne se sont réellement développés qu'à partir de l'avènement de l'épidémie de sida. Néanmoins, l'étude de l'architecture de la paroi des mycobactéries atypiques avait fait l'objet de travaux de microscopie électronique dès 1981, travaux qui avaient permis d'évoquer dès cette époque l'hypothèse que la paroi des mycobactéries atypiques jouait un rôle majeur dans leur virulence et dans la résistance naturelle de ces bactéries aux antituberculeux classiques (49). Parallèlement, la caractérisation biochimique des peptidoglycolipides de paroi de *M. avium* fut réalisée à la même époque (9). Par la suite, l'implication de la paroi dans les phénomènes d'inhibition de la fusion des compartiments phagosome-lysosome fut précisée, travaux qui permettaient d'avoir une idée des mécanismes de la pathogenèse de *M. avium*, une bactérie intracellulaire (21). Quelques étapes de l'interaction de ces microorganismes avec les macrophages sont illustrées dans la figure 1. Un modèle de paroi mycobactérienne fut également élaboré, soulignant la nature tripartite de la paroi (contenant jusqu'à 40 % de lipides), ainsi que le rôle majeur des composés

Figure 2.

Etude des mycobactéries par cryo-décapage et cryo-fracture et organisation générale de l'enveloppe mycobactérienne (d'après 45,51).  
 A study of mycobacteria by freeze-etching and freeze-fracture electron microscopy and the general organisation of the mycobacterial cell envelope (adapted from 45, 51).



(A) Observation de la face interne de fracture de la paroi (CWIF) chez les bactéries traitées par la polymyxine-E; (B) Observation de la face interne de fracture de la paroi (CWIF) et de la face externe de la fracture (CWOE) chez les bactéries traitées par l'alcool phénéthylrique; (C) Organisation en couches successives de la paroi mycobactérienne et observation de la face protoplasmique (PF); (D) Vue schématique de l'organisation générale de la paroi des mycobactéries; CM, membrane cytoplasmique; IL, couche interne; TL, couche membranaire transparente aux électrons; OL, couche externe; CWS, squelette de la paroi; AG, arabinogalactane; PG, peptidoglycane; ETL, couche pariétale transparente aux électrons; CAP, capsule; TDM, tréhalose dimycolate; SL, sulfolipide; LOS, lipooligosaccharide; PGL, phénolglycolipide; PL et PIM, phospholipides; F, phase de fracture; P, porine.

glycolipidiques de la couche externe (figure 2) (45, 51). Cette couche externe, organisée comme une monocouche structurée, se comporte comme une bicouche fonctionnelle en excluant notamment de nombreux médicaments (45, 51). Dès l'apparition du sida, de nombreux travaux de recherche thérapeutique sur le complexe MAC ont été effectués et ont notamment porté sur la recherche de synergies d'antibiotiques efficaces pour traiter ou prévenir l'apparition des infections mycobactériennes (50). Parallèlement, la recherche des bases moléculaires des variations morphologiques observées chez *M. avium* en rapport avec l'observation de changements de virulence et

de changements d'expression des cytokines chez l'hôte constitue un sujet de recherche extrêmement actif (44, 58). En ce sens, nous avons récemment démontré qu'il existait des différences importantes de réponses des macrophages sur la synthèse du TNF, du GM-CSF et, à un moindre niveau, de l'IL6 selon que les macrophages étaient infectés par une espèce de mycobactéries pathogène ou non pathogène (4). Récemment, de nouvelles techniques de diagnostic rapide et de génotypage qui s'appliquent aux mycobactéries atypiques ont été mises au point (62, 67); elles ouvrent un nouveau champ d'investigation dans le domaine de l'épidémiologie génétique des infections mycobactériennes.

Études antérieures des différences entre *M. avium* et *M. intracellulare* par utilisation de marqueurs phénotypiques et génotypiques

La classification des mycobactéries du complexe *M. avium* a été tout d'abord réalisée par méthode de séroagglutination sur cellules en présence d'anticorps polyclonaux (56). Par la suite, une corrélation a été établie à la fois entre ces résultats et la nature chimique des antigènes agglutinants (peptido-glycolipides), décrite tout d'abord par chromatographie sur couches minces puis par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, ainsi que les résultats des études de virulence sur animal (57). Ces résultats ont abouti à inclure 28 sérovars sous le terme de complexe *M. avium*. L'ajout de 3 sérovars caractéristiques de *M. scrofulaceum* définissait le complexe MAIS (*M. avium-intracellulare-scrofulaceum*). *M. avium* stricto sensu correspondait aux sérotypes 1-3, *M. intracellulare* aux sérotypes 12-28, tandis que 8 sérovars intermédiaires (sérotypes 4-11) restaient taxonomiquement mal définis.

Plusieurs études portant sur la caractérisation d'isoenzymes de *M. avium* isolées de bétail atteint de paratuberculose (maladie de JOHNE) et de *M. avium* isolées du pigeon ramier ("*wood pigeon*") avaient montré que, malgré la présence de nombreux antigènes communs, on pouvait observer en immunoelectrophorèse des différences entre ces sous-espèces (figure 3) (64), et que les isoenzymes pouvaient constituer de bons marqueurs taxonomiques (6). Par ailleurs, d'autres données de microscopie électronique et d'immunoelectrophorèse montraient clairement qu'il existait probablement des mécanismes de régulation

de l'expression des antigènes de surface par passage d'hôte à hôte, antigènes de surface qui sont en partie responsables de la virulence des mycobactéries atypiques. L'architecture des parois de mycobactéries atypiques "recyclées" de macrophages en macrophages était en effet très nettement différente au niveau des antigènes de surface de celle de mycobactéries atypiques cultivées sur milieu synthétique en laboratoire (22). Ces travaux portant sur les différences existant tant du point de vue biochimique qu'immunologique entre des bactéries de la même espèce "*M. avium*" laissaient à penser que la taxonomie du complexe MAC n'était pas définitive.

Apport des tests d'hybridation ADN/ADN et des marqueurs moléculaires à la taxonomie du complexe MAC : révision de la classification des sérovars, découverte de nouvelles sous-espèces

Grâce à des travaux d'hybridation ADN-ADN, méthode de référence en taxonomie bactérienne, il fut démontré par la suite que les sérovars 1-6 et 8 appartenaient en fait à l'espèce *M. avium* alors que les sérovars 7, 12, 14, 16 et 18 appartenaient à l'espèce *M. intracellulare*. La classification des autres sérotypes n'avait pas été réalisée par cette méthode de référence (3). Ces travaux furent confirmés et étendus en 1990 par SAITO et coll. qui démontrèrent que les sérotypes 9-11 et 21 appartenaient également à l'espèce *M. avium* (55). Par la suite, d'autres équipes dont la nôtre confirmèrent cette classification (59, 63). Les mêmes tests d'hybridation ADN-ADN permirent également de démontrer que *M. paratuberculosis*, agent de l'entérite nécrosante du bétail (maladie de JOHNE) et isolé dans certains cas chez des patients souffrant de la maladie de CROHN, était en fait une sous-espèce de *M. avium* qui fut rebaptisée *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Il fut également

démonstré que la sous-espèce isolée du pigeon ramier appartenait à l'espèce *M. avium* et elle fut rebaptisée *M. avium* subsp. *silvaticum* (65). Par ailleurs, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* est caractérisée par une croissance dépendante de la mycobactine, sidérophore du fer pour cette sous-espèce. La sous-espèce *silvaticum* est un pathogène strictement aviaire et des mammifères, mais elle n'a jamais été associée à une maladie humaine. De nombreuses différences génétiques caractérisent ces trois sous-espèces, notamment en ce qui concerne la présence de diverses séquences d'insertion comme on le verra par la suite.

## Méthodes de caractérisation moléculaire des infections dues au complexe *Mycobacterium avium*-intracellulaire

Les caractéristiques biochimiques et culturelles de ces deux espèces sont similaires et le diagnostic différentiel d'espèce est difficile par les tests classiques (tableau I). De nouvelles techniques de diagnostic moléculaire permettent de séparer les deux espèces de MAC, soit par hybridation avec des sondes d'ADN spécifiques d'espèces (28, 55, 60), soit par des méthodes rapides basées sur la réaction de PCR (7, 11, 29, 33, 43). Parmi ces dernières techniques, la PCR-RFLP récemment développée (62) permet de séparer *M. avium* de *M. intracellulare*. Enfin, le séquençage direct, qu'il s'agisse du gène codant l'ARNr 16S (24), du gène *hsp65* ou de la séquence espaceur des ARN16S et 23S (ITS1), permet également de différencier *M. avium* de *M. intracellulare* et d'étudier à l'intérieur d'une espèce la diversité génétique de ces populations bactériennes. L'espèce *M. intracellulare* apparaît comme étant une espèce plus homogène que l'espèce *M. avium* qui comprend au moins trois sous-espèces:

*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* et *M. avium* subsp. *silvaticum* qui diffèrent par leurs caractéristiques épidémiologiques et environnementales (65).

### Méthodes de diagnostic d'espèce du complexe MAC

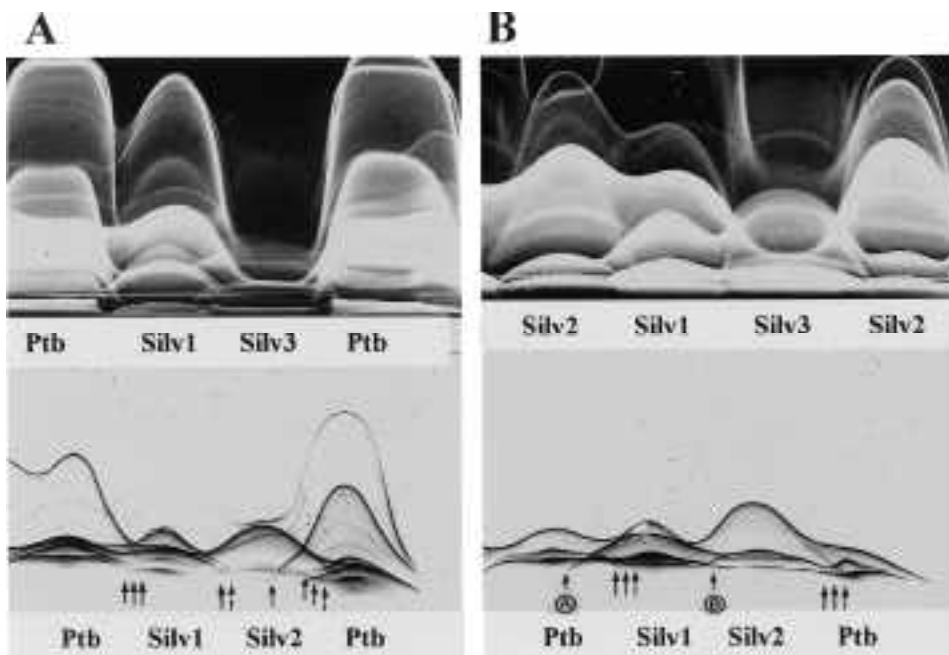
Nous étudierons ici quatre tests moléculaires : le test AccuProbe®, la PCR DT1-DT6, la PCR du gène *hsp65* suivi d'une digestion par une enzyme de restriction (PCR-RFLP ou PRA), et le séquençage du gène codant l'ARNr 16S.

#### Le test AccuProbe®

L'utilisation du test commercial AccuProbe® (Gen-Probe Inc., San Diego, Calif.) pour l'identification des cultures est d'une aide précieuse pour les laboratoires de bactériologie clinique car il est facile et rapide. Ce test consiste à hybrider les ARNr 16S avec une sonde spécifique d'espèce marquée à l'ester d'acridinium et révélée par chimioluminescence. Cette méthode a une spécificité égale à 100 % et une sensibilité comprise entre 87 et 95 % selon les études (68, 70).

Figure 3.

Exemple d'immunoélectrophorèse en fusée (FRIEP) à l'aide d'immunsérums de lapins anti-*M. paratuberculosis* et anti-*M. silvaticum*. Les gels sont colorés au moyen d'une réaction mettant en évidence la peroxydase (d'après 64).  
An illustration of fused rocket immunoelectrophoresis using antisera raised in rabbits against *M. paratuberculosis* and *M. silvaticum*. The immunoprecipitates obtained were stained for the peroxidase enzyme reaction (adapted from 64).



(A) Electrophorèse des antigènes de *M. paratuberculosis* (Ptb) et de *M. silvaticum* (Silv1 à Silv3) contre l'antisérum anti-*M. Ptb* ; (B) Electrophorèse des antigènes de *M. paratuberculosis* (Ptb) et de *M. silvaticum* (Silv1 à Silv3) contre l'antisérum anti-*M. Silv2*. Les flèches (une flèche par immunoprécipité) indiquent des lignes de précipitation séparant les sous-espèces. La flèche A souligne des antigènes communs entre les souches Ptb, Silv1 et Silv2 et la flèche B montre des immunoprécipités spécifiques séparant les souches Silv1 et Silv2.

Ces exemples illustrent que, malgré des antigènes communs entre *M. paratuberculosis* et *M. silvaticum*, des immunoprécipités spécifiques mettent en évidence des différences antigéniques entre ces deux sous-espèces.

Tableau I.

Caractéristiques biochimiques et culturales des espèces et sous-espèces du complexe *M. avium* (d'après 65).  
*Biochemical and cultural characteristics of the species and subspecies of the M. avium complex (adapted from 65).*

caractéristique	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>		
		subsp. <i>avium</i>	subsp. <i>paratuberculosis</i>	subsp. <i>silvaticum</i>
croissance à 42 °C	±	±	+	+
croissance à 37°C	+	+	+	+
croissance à 30°C	-	-	ND	ND
stimulation par le pyruvate mycobactine (2µg/ml)	+	±	+	-
requis pour la croissance	-	-	+	-
croissance sur milieu à base d'oeuf	ND	-	+	-
tolérance à 5% NaCl	-	+	-	-
catalase 68°C	+	+	+	+
hydrolyse du Tween 80	-	-	-	-
niacine	-	-	-	-
<b>croissance en présence de :</b>				
D-cyclosérine (30 µg/ml)	+	+	+	+
D-cyclosérine (50 µg/ml)	-	-	+	-
éthambutol (7,5 µg/ml)	+	+	+	+
pyrazinamide (50 µg/ml)	+	+	+	+
rifampicine (1 µg/ml)	+	+	+	-
ansamycine (1 µg/ml)	±	±	+	-
streptomycine (2 µg/ml)	+	+	+	+

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

### La réaction de PCR DT1-DT6

DT1 et DT6 sont deux fragments respectivement spécifiques de *M. intracellulare* et *M. avium* isolés à partir d'une souche de *M. avium* (sérotypage 2). Deux tests par PCR ont été développés qui permettent de mettre en évidence, soit un fragment de 187 bp (*M. avium*), soit un fragment de 666 bp (*M. intracellulare*) sur gel d'agarose. Ce test possède une bonne sensibilité et spécificité. Il est corrélé dans 90 % des cas avec les résultats obtenus par AccuProbe® (15). Une étude récente comparant la méthode AccuProbe® à la méthode PCR DT1-DT6 a montré que les souches *M. avium* et *M. intracellulare* négatives par le test AccuProbe® mais positives par la sonde MAC, sont identifiées par la PCR DT1-DT6 comme étant des *M. intracellulare* (15).

### PCR-RFLP sur le gène *hsp65* et sur la région inter 16S-23S

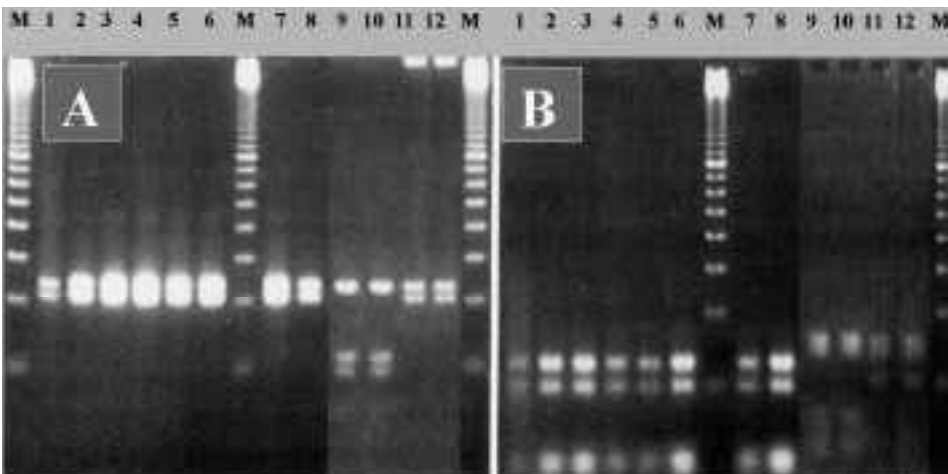
Décrite initialement par A. TELENTI en 1993, le PCR-RFLP du gène *hsp65* (PRA) possède l'avantage de permettre une identification spécifique des espèces *M. avium* et *M. intracellulare* parmi une trentaine d'espèces de mycobactéries (16,

62). Elle repose sur la détection du polymorphisme du gène *hsp65* qui code une protéine de choc thermique. Après amplification d'un fragment de 441 bp par deux amorces situées dans une région conservée du gène, le polymorphisme spécifique d'espèce est mis en évidence directement sur gel d'agarose par le nombre et par la taille des fragments identifiés après digestion par les enzymes de restriction *BstEII* ou *HaeIII* (16, 62). Une étude précédente a montré que les espèces *M. avium* et *M. intracellulare* sont caractérisées par au moins 5 profils distincts en PRA (15, 16). Toutefois, cette méthode qui discrimine facilement *M. avium* de *M. intracellulare*, ne permet pas de distinguer entre les différentes sous-espèces du complexe *M. avium*, c'est-à-dire *M. avium*, *M. paratuberculosis* et *M. silvaticum* (figure 4). En effet, parmi les cinq profils obtenus pour les différentes espèces et sous-espèces de MAC, un seul profil (profil C) regroupe l'ensemble des sous-espèces de *M. avium* (figure 5). Cependant, une étude récente sur des souches de *M. avium* du Brésil a révélé l'existence de deux nouveaux profils de PRA pour l'espèce *M. avium*, ces profils sont identiques à ceux de *M. simiae* II et *M. kansasii* I (37). La méthode PRA permet donc une identification correcte pour un grand nombre d'espèces mais, pour quelques profils, elle n'est pas très discriminante. Avec l'augmentation du nombre d'études portant sur le PRA, il est possible que de nouveaux variants du complexe *M. avium* soient identifiés dans les années à venir.

Récemment, une nouvelle cible a été proposée pour caractériser au niveau de l'espèce les mycobactéries atypiques (1). Il s'agit des séquences situées entre les gènes codant les ARNr 16S et 23S qui sont caractérisées par une forte diversité à la fois au niveau des espèces et des genres. Cette diversité est due principalement à des variations dans le nombre et les types des séquences des ARN de transfert situées à l'intérieur des espaceurs. D'après une étude récente, *M. avium* et *M. intracellulare* possèdent des profils spécifiques dans cette région après digestion des produits d'amplification (35). Plus récemment, les séquences espaceurs de nombreuses mycobactéries ont été publiées et la taxonomie des mycobactéries par cette technique est comparable à celle obtenue par séquençage de l'ARNr 16S (54). Cette approche devrait permettre, grâce à de nouvelles méthodes de PCR-RFLP, de résoudre des problèmes taxonomiques au sein des mycobactéries atypiques.

Figure 4.

Un exemple de PCR-RFLP du gène *hsp65* chez les membres du complexe *M. avium* et *M. scrofulaceum*.  
*Illustration of PCR-RFLP of hsp65 for the members of the M. avium complex and M. scrofulaceum.*



Electrophorèse du produit de l'amplification de 441 bp après digestion par l'enzyme de restriction *BstEII* (A), ou par *HaeIII* (B). Abréviations : M, marqueur moléculaire "100 bp ladder" ; 1, *M. avium* ; 2-4, souches types de *M. paratuberculosis* ; 5, isolat animal de *M. paratuberculosis* ; 6-7, souches de *M. paratuberculosis* isolées de patients atteints de maladie de Crohn ; 8, *M. silvaticum* ; 9-10, souche type et un isolat clinique de *M. intracellulare* ; 11-12, *M. scrofulaceum*.

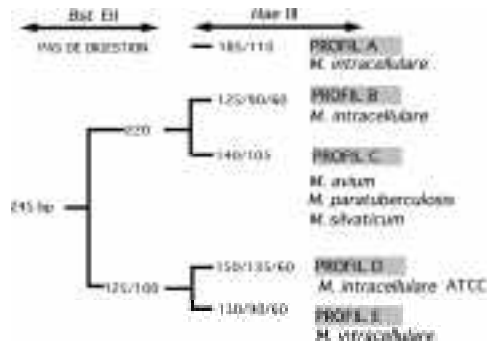
### Séquençage du gène codant l'ARNr 16S

Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S permet une bonne identification des mycobactéries (24), mais cette technique demeure relativement lourde et inaccessible à l'ensemble des laboratoires de routine. Par ailleurs, d'un point de vue taxonomique, avec l'élargissement des banques de données de séquence et l'apparition de nombreux variants, il apparaît que les techniques de séquençage ne sont pas toujours les plus adaptées à une détermination taxonomique extrêmement rigoureuse, compte tenu de la détection de nombreux variants à l'intérieur de l'espèce selon les loci séquencés (61).

Figure 5.

Algorithme basé sur la méthode PRA (PCR-RFLP du gène *hsp65*) pour les espèces *M. avium*-*M. intracellulare* (d'après 15,16).

An algorithm based on the PRA method (PCR-RFLP of the *hsp65* gene) for the species *M. avium* and *M. intracellulare* (adapted from 15, 16).



Dans cet exemple, les espèces *M. avium*-*M. intracellulare* sont caractérisées par au moins 5 profils distincts en PRA (A à E). Cette méthode permet de séparer *M. avium* de *M. intracellulare*, mais pas les sous-espèces à l'intérieur de *M. avium* (ssp. *avium*, *paratuberculosis* et *silvaticum*), qui sont toutes regroupées dans le profil C.

## Méthodes de génotypage : séquences d'insertion

À l'intérieur du complexe MAC plusieurs séquences d'insertion différentes ont été décrites (tableau II), dont certaines sont spécifiques d'une sous-espèce (tableau III), par exemple IS900 pour *M. paratuberculosis*. Les séquences IS1245 (28) et IS1311 (53) sont majoritairement retrouvées chez *M. avium* tandis que IS1141 est spécifique de *M. intracellulare* (69). Cependant, d'autres séquences IS ont été également identifiées et permettent l'analyse des souches apparentées; il s'agit de IS900 (26), IS901 (34), IS902 (41), IS1110 (30). Ces études montrent une grande diversité au niveau du polymorphisme rencontré chez les isolats humains et animaux de *M. avium*-*intracellulare*. Les séquences d'insertions IS900, IS901, IS902 et IS1110 font partie de la famille IS110, alors que les séquences d'insertions IS1245 et IS1311 font partie de la famille de IS256 (39).

### IS appartenant à la famille IS110

La famille IS110 possède des séquences répétées inversées (7 pb) de chaque côté de la séquence d'insertion ainsi qu'une phase ouverte de lecture codant une transposase (39). La première séquence d'insertion de ce type à avoir été décrite est IS900, caractéristique de *M. paratuberculosis* (26). Elle est composée de 1451 pb et possède des répétitions inversées, de part et d'autre de cet élément, et d'une phase ouverte de lecture de 399 acides aminés homologues à la séquence d'insertion IS110

Tableau II.

Caractéristiques des différentes séquences ou éléments d'insertion chez les membres du complexe *M. avium*.

Characteristics of various sequences or insertion elements described among the members of the *M. avium* complex.

élément	nb pb	famille	nbcopies	IR	DR	n° d'accession	réf.
DT1	876	NA	1	NA	NA	L04543	(63)
DT6	719	NA	1	NA	NA	L04542	(63)
IS900	1451	IS110	14-18	0	0	X16293	(26)
IS901	1472	IS110	10-14	0	0	X59272	(34)
IS902	1470	IS110	10-14	0	0	X58030	(41)
IS1245	1313	IS256	0-27	31/40	ND	L33879	(28)
IS1311	1259	IS256	0-27	15	ND	U16276	(53)
IS1110	1457	IS110	1-5	0	0	Z23003	(30)
IS1141	1588	IS3	ND	18/23	ND	L10239	(69)
IS1613	1453	IS110	1-8	ND	ND	AJ0011837	(10)

IR : répétitions inversées (en pb) dans la partie terminale de l'IS

DR : répétitions directes (en pb) dans la séquence cible

NA : non applicable ; ND : non déterminé

de *Streptomyces coelicolor* A3 (26). La présence des séquences d'insertion IS901 et IS902 est associée aux souches de *M. avium* de type aviaire, *M. silvaticum* (8, 41). L'homologie de séquence en acides nucléiques entre IS901 et IS902 est de 98 % (41). La séquence d'insertion IS901 (1472 pb) présente une homologie de séquence de 60 % avec IS900. Quant à IS902 (1470 pb), cette séquence est répétée 10 à 12 fois par génome. Ces deux séquences d'insertion possèdent un cadre de lecture ouvert de 1200 paires de bases similaire à la séquence d'insertion IS900 (34, 41). La séquence IS1110 (1457 pb), trouvée uniquement chez *M. avium*, possède aussi une homologie de 60 % pour la séquence ADN avec IS900, ainsi qu'un cadre de lecture ouvert de 1200 paires de bases (30).

La transposase de IS900 est appelée p43 et peut être détectée par des méthodes immunologiques (66). Récemment, cette protéine p43 a été clonée dans un plasmide puis introduite dans *Escherichia coli* et *Mycobacterium smegmatis* (42). La bactérie *M. smegmatis* recombinante croît lentement, la croissance rapide est restaurée quand on ajoute de la mycobactine ferrique J (un sidérophore) au milieu de culture; par contre, aucun effet sur la vitesse de croissance n'a été observé chez *E. coli* recombinant (42). Chez le recombinant d'*E. coli*, on constate l'expression d'une protéine reconnue par les anticorps anti-p43; cette expression est absente chez le recombinant de *M. smegmatis*. Cette étude suggère que IS900 joue un rôle dans la dépendance à la mycobactine et dans la croissance lente de *M. paratuberculosis* (42). Les séquences d'insertion IS900 et IS902 possèdent une deuxième phase ouverte de lecture (ORF2) qui est située sur le brin complémentaire du gène codant la transposase, la protéine p43 pour IS900 (18). L'analyse de la séquence en acides aminés montre que cet ORF2 pourrait encoder une protéine de transport. Cette protéine pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la pathogénicité de *M. paratuberculosis* et de *M. silvaticum* (18). Cet ORF2, appelé *hed* pour expression dépendante de l'hôte, ne possède pas de promoteur dans la séquence d'insertion. L'analyse des sites d'insertion de cet élément suggère une insertion de IS900 entre le site de liaison du ribosome (RBS) d'un gène mycobactérien et le codon "start" de ce même gène hôte. Le promoteur du gène *hed* est donc apporté par le site d'insertion de IS900 dans le génome de *M. paratuberculosis* (19). Ceci a été confirmé en détectant l'expression de *hed* chez *M. paratuberculosis* au niveau de la transcription de ce gène par RT-PCR (PCR transcriptase-inverse). Des anticorps spécifiques de la protéine Hed ont détecté les produits de traduction de ce gène en Western-blot à partir d'extraits protéiques de *M. paratuberculosis* (19).

### IS appartenant à la famille IS256

Les séquences d'insertion IS1245 et IS1311, qui font partie de la famille des IS256 sont présentes en nombre de copies variable chez toutes les sous-espèces de *M. avium*. Les membres de cette famille ont une taille comprise entre 1298 pb et 1486 pb, avec des séquences répétées inversées de 24 à 41 pb. La séquence d'insertion IS1245, normalement absente chez *M. intracellulare*, se trouve dans la quasi totalité des souches de *M. avium* (tableau III); toutefois, de rares souches de *M. avium* ne possédant pas de IS1245 et quelques souches de *M. intracellulare* possédant IS1245 ont été décrites (52). La séquence d'insertion IS1311, présentant une homologie de séquence d'ADN de 80 % avec IS1245, se trouve chez toutes les sous-espèces de *M. avium* en nombre de copies variable. Le nombre de copies de IS1245 et de IS1311 est équivalent pour une même souche (17). Des mutations ponctuelles

Tableau III.

Distribution des différentes séquences ou éléments d'insertion chez les membres du complexe *M. avium*.

*Distribution of various sequences or insertion elements among the members of the M. avium complex*

élément	M. intracellulare		M. avium	
		subsp. avium	subsp. paratuberculosis	subsp. silvaticum
DT1	+	±	ND	ND
DT6	-	+	ND	ND
IS1245	-	+	+	+
IS1311	-	+	+	+
IS900	-	-	+	-
IS901	-	+	-	+
IS902	-	+	-	+
IS1110	-	+	ND	ND
IS1141	+	-	-	-
IS1613	+	+	-	-

ND :non déterminé ;+ :présence de l'élément ;- :absence de l'élément  
± :Présence de l'élément dans certaines souches

dans IS1311 sur des souches de *M. avium* et *M. paratuberculosis* permettent de détecter par PCR-RFLP ces différences selon les souches isolées chez le mouton et le bétail. Cette technique récente peut être utilisée dans le diagnostic et le contrôle de la maladie de JOHNE (40).

La plupart des isolats humains de *M. avium* montre un nombre de copies de IS1245 élevé, souvent associées avec les serovars 4, 6 et 8. Les isolats de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* possèdent un profil RFLP à 6 bandes. Quant aux souches de type aviaire, elles possèdent 3 copies de IS1245, elles ont le même profil en IS901 et sont très semblables par électrophorèse en champ pulsé (pulsed field gel electrophoresis, PFGE; 8, 52). Cependant, de rares souches de *M. avium* de type non-aviaires et souvent associées avec les serovars 1, 2 et 3, peuvent également contenir 3 copies d'IS1245. Toutefois, ces dernières possèdent un profil IS901-RFLP facilement distinct de ceux de *M. avium* ssp. *silvaticum* (52). Par contre, les isolats provenant de prélèvement d'origine porcine n'ont pas de IS901 mais un grand nombre de copies de IS1245 (8).

## Autres sources de mise en évidence de diversité génétique

### La séquence inter ADNr 16S-23S

Comme déjà cité ci-dessus, les différentes séquences situées entre les gènes codant les ARN ribosomiaux 16S et 23S (ITS, internal transcribed spacer), qui sont connues pour chaque espèce de mycobactéries, ont été comparées entre chaque espèce. Cette étude a montré que les séquences de *M. paratuberculosis* (4 séquences) sont toutes identiques. Le même phénomène est observé pour les autres mycobactéries pathogènes (par exemple *M. leprae* et le complexe *M. tuberculosis*) alors que, pour les souches de *M. avium*, il existerait au moins 4 séquences ITS différentes, variant de 1 à 2 nucléotides pour chaque séquence. Cette situation est la même pour les autres espèces de mycobactéries de l'environnement (23). Ceci suggère que chacune des espèces pathogènes serait le résultat d'une évolution récente (23).

### La séquence GS

Un élément de 6 500 pb nommé GS, avec une possible séquence d'insertion à une extrémité, a été isolé chez *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* ssp. *silvaticum* par une technique de soustraction génomique (66). Cet élément est absent chez *M. avium*. Il possède un contenu en GC moins élevé que le reste du génome bactérien, caractéristique fréquem-

ment rencontrée dans les îlots de pathogénicité. Cette séquence coderait 5 protéines dont les gènes homologues sont retrouvés dans de nombreuses espèces bactériennes, principalement des bacilles Gram-négatifs ainsi que chez *M. tuberculosis*, y compris des agents pathogènes entériques (66). Les gènes homologues de cet élément codent des enzymes impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides ou des polysaccharides extracellulaires. Il pourrait y avoir un lien avec la virulence mais aucun lien direct avec la pathogénicité n'a été montré pour l'instant (66).

## Épidémiologie et bases moléculaires de la transmission

### Problématique épidémiologique

À l'heure actuelle, l'hypothèse concernant la virulence spécifique de différentes sous-espèces de MAC vis-à-vis de leurs hôtes respectifs n'a pas encore été élucidée au niveau moléculaire. En effet, la combinatoire des interactions possibles entre la diversité génotypique et phénotypique des MAC d'une part, et celle des réponses immunitaires des hôtes potentiels d'autre part, est loin d'être comprise. Néanmoins, cette hypothèse est plausible et réaliste. Par exemple, il est clair que les structures glycopeptidolipidiques de la paroi de *M. avium* varient selon les souches et peuvent entraîner des réponses immunologiques variables (47), dont certaines sont probablement communes à plusieurs espèces d'hôtes, tandis que d'autres pourraient être spécifiques d'une interaction donnée (48). Inversement, un changement d'hôte entraîne pour le parasite une possibilité d'acquérir de nouvelles propriétés qui pourraient le rendre ultérieurement plus pathogène par rapport à une autre espèce. Ce phénomène de renforcement de la virulence par passage d'hôte en hôte déjà connu pour certains virus, n'a pas encore été démontré pour expliquer les bases moléculaires de la transmission inter-espèces du complexe *M. avium*. Bien que tous les sérotypes de *M. avium* soient présents dans l'environnement, certains sérotypes sont plus prévalents que d'autres parmi les souches isolées de patients. Par exemple, aux États-Unis, les sérotypes prévalents chez les patients atteints de sida sont les sérotypes 1, 4 et 8, qui représentent 2/3 de la totalité des infections à *M. avium*. (5).

### Données épidémiologiques actuelles sur la possibilité de transmission inter-espèces

#### Situation chez l'homme

En l'absence de transmission connue de patient à patient, il est extrêmement probable que l'homme s'infecte à partir de sources environnementales (14). Il fut tout d'abord suspecté que la porte d'entrée de *M. avium* était uniquement pulmonaire mais, rapidement, on réalisa que la voie digestive pouvait constituer également une excellente voie d'entrée chez les patients immunodéprimés (31). Les mycobactéries du complexe *M. avium* sont en effet des bactéries ubiquistes de l'environnement, présentes dans les eaux potables ou eaux d'égouts, les sols (terre, fumier) ainsi que les aliments (lait, végétaux, viandes) (73). Plusieurs études récentes mettent en évidence l'eau potable des hôpitaux (et des réseaux d'eau plus généralement) comme source potentielle de contamination des patients sidéens par *M. avium* (2, 71). On retrouve aussi ces bactéries dans de nombreuses niches écologiques comme le sol, les poussières, les plantes en pots (25, 31, 72) et même les cigarettes (20). Néanmoins, il demeure extrêmement difficile d'établir un lien

entre la mise en évidence de ces mycobactéries et la pathogénèse de certaines infections. En ce qui concerne la maladie de CROHN, il est bien établi, avec la mise en évidence de *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, que, dans certains cas, cette maladie et d'autres maladies inflammatoires des intestins pourraient avoir une étiologie bactérienne (12). Par ailleurs, il a été bien établi que les volailles, susceptibles de contracter la tuberculose aviaire, pouvaient être infectées par un nombre limité de clones de *M. avium* qui présentent des caractéristiques génétiques qui diffèrent beaucoup de celles des isolats humains et porcins. Inversement, il a été également démontré que les souches de *M. avium* d'origine porcine et humaine partagent de nombreuses caractéristiques génotypiques similaires. La signification épidémiologique de ces similarités est encore inconnue : soit il existe un réservoir commun aux infections humaines et porcines, soit la consommation de viandes mal cuites ou de produits carnés provenant de porcs positifs pour *M. avium* constitue un risque d'infection pour les patients immunodéprimés (8). Des résultats identiques qui confirment ces hypothèses ont été obtenus récemment aux Pays-Bas (32). En Italie, une étude récente a montré que 40 % des souches de *M. avium* isolées de patients sidéens présentaient des similitudes au niveau du profil de IS1245 ; ceci suggère qu'un type prédominant de souches serait associé aux patients sidéens (36).

#### Situation chez l'animal

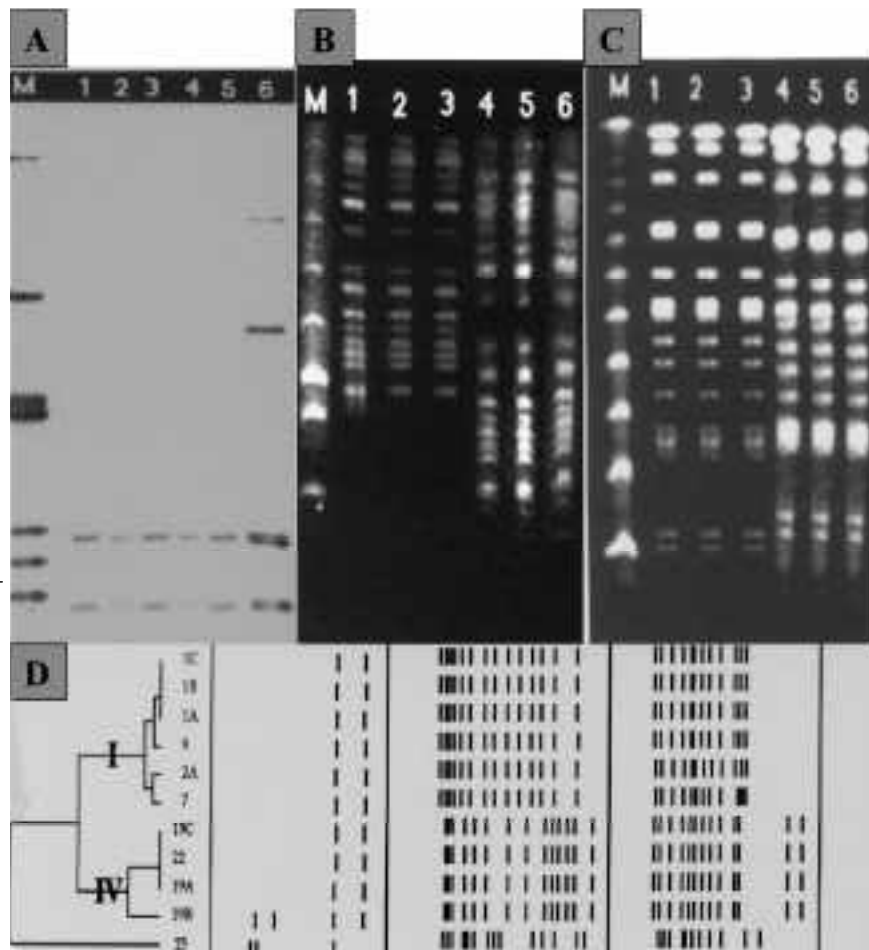
La maladie de JOHNE ou paratuberculose affecte principalement les ruminants. Elle est responsable de pertes économiques importantes (12, 13). En ce qui concerne les modes de transmission à l'animal, la voie oro-fécale est la plus importante voie de transmission, mais on sait aussi que la transmission peut avoir lieu *in utero* et par le sperme infecté, le colostrum ou le lait. Il est important de savoir si la paratuberculose peut être transmise d'une espèce à une autre. Un modèle expérimental animal (lapin) montre que cette espèce peut être infectée par des souches bovines de *M. avium* ssp. *paratuberculosis*. Par ailleurs, il existe des cas de maladies chez la chèvre et le mouton qui ont pâture avec des ruminants. Il semble qu'il existe des réservoirs sauvages de *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, en particulier chez les cervidés et le bétail. La possibilité d'une transmission inter-espèces, couplée avec ces données épidémiologiques sur la paratuberculose chez ces espèces sauvages, pourrait permettre de mieux contrôler à terme cette maladie. Par ailleurs, si cette transmission a effectivement lieu dans des zones de contact entre animaux sauvages et animaux domestiques, les pratiques actuelles de diagnostic et de sélection du bétail seront inefficaces à long terme pour éradiquer cette maladie et une vaccination pourrait être envisagée. Récemment, il a été démontré qu'en Ecosse il n'était pas possible de discriminer d'un point de vue moléculaire des isolats de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* isolés de lapins sauvages de ceux

provenant d'isolats du bétail. Ces animaux sauvages semblent donc constituer un réservoir pouvant infecter les troupeaux, auquel cas il existe bien des cas de transmission inter-espèces de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* entre espèces sauvages et domestiques. (27).

**Utilisation du typage moléculaire pour l'étude de la transmission de *M. avium*: exemple d'une étude de souches isolées à partir de patients sidéens dans la région Antilles-Guyane**  
Le typage moléculaire occupe une place nouvelle dans la lutte contre les infections mycobactériennes. D'un point de vue pratique, il améliore la mise en évidence des liens épidémiologiques potentiels entre les isolats cliniques de différents patients. Ainsi, il permet de mieux comprendre la part réelle de la transmission. C'est également une méthodologie de pointe pour la mise en évidence des infections nosocomiales (par exemple la contamination des patients sidéens à partir du système d'eau potable à l'hôpital) et pour l'étude des liens phylogéniques entre les souches. Ci-dessous, nous allons brièvement décrire notre expérience concernant l'épidémiologie de *M. avium* dans la région Antilles-Guyane.

Figure 6.

Typage moléculaire par l'électrophorèse en champ pulsé des souches de *M. avium* contenant un faible nombre de copies d'IS1245.  
Molecular typing of low IS1245 copy number *M. avium* isolates by pulsed field gel electrophoresis.



Le typage de *M. avium* par IS1245 (A) et par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) après digestion par *XbaI* (B) ou *DraI* (C). La figure D montre l'ensemble des résultats obtenus par les trois méthodes sous forme d'un dendrogramme établi par l'analyse numérique combinée. On peut remarquer que la méthode PFGE permet de séparer les souches à faible nombre de copies de IS1245 (grappe B) en deux sous-grappes : la sous-grappe I contenant 6 isolats provenant de 4 patients sidéens d'un même hôpital, et la sous-grappe IV contenant 4 isolats de 2 patients (y compris un isolat qui semblait présenter 2 copies additionnelles de IS1245 de 3,5 kb et de 5 kb et avait initialement été considéré comme une évidence d'infection polyclonale ; voir figure 6A, piste 6).



Des travaux antérieurs de notre laboratoire avaient permis de détecter des grappes de souches identiques de *M. avium* chez des patients sidéens en Guadeloupe, dont l'origine n'avait pu être recherchée à l'époque (59). Au moins deux grappes de souches avaient été détectées: la première ayant deux copies de IS1245 et comprenant sept souches isolées chez quatre patients, et la deuxième grappe ayant 27 copies de IS1245 et se composant de trois souches isolées de deux patients (17). Récemment, nous avons pu compléter cette étude par la caractérisation de l'ensemble des souches de *M. avium* isolées dans la région Antilles-Guyane entre 1994 et 1998 (38). Un total de 45 souches de *Mycobacterium avium* isolées de 31 patients VIH-positifs a été analysé par IS1245-RFLP et PFGE, et quelques exemples sont illustrés dans la figure 6. Deux souches de *M. avium* isolées en Guyane française ne possédaient pas de séquence d'insertion IS1245. Les empreintes obtenues par IS1245 ont permis de distinguer trois grappes qui comprenaient trois souches à 27 copies (grappe A trouvée chez deux patients), neuf souches à deux copies (grappe B trouvée chez six patients) et trois souches à 20 copies (grappe C trouvée chez trois patients). Les résultats de PFGE obtenus après digestion par *XbaI* ou *DraI* ont donné des résultats similaires et ont confirmé la clonalité des grappes à nombre de copies de IS1245 élevé (grappes A et C). Cependant, la technique de PFGE a permis de séparer les souches à faible nombre de copies de IS1245 (grappe B) en deux sous-grappes: la sous-grappe I contenait 6 isolats cliniques provenant de quatre patients tous hospitalisés dans le même hôpital de Guadeloupe et la sous-grappe IV qui comptait quatre isolats provenant de deux patients, dont trois pour le seul patient 19 (figure 6-D). De manière intéressante, dans ce dernier cas, la technique de PFGE a permis de regrouper les trois isolats du patient 19, alors que les résultats de IS1245 montraient que deux isolats sur trois seulement étaient identiques (en effet, le dernier isolat clinique semblait présenter deux copies additionnelles de IS1245 de 3,5 kb et de 5 kb et avait initialement été considéré comme une évidence d'infection polyclonale). Une analyse numérique combinée des résultats de PFGE et de RFLP corrobore l'existence de quatre et non de trois grappes. Une comparaison des résultats de IS1245-RFLP vis-à-vis des résultats de PFGE suggère que la procédure de RFLP standardisé n'est utilisable qu'avec les isolats cliniques présentant cinq copies de IS1245 ou plus. En conséquence, les résultats de typage moléculaire pour les isolats présentant des nombres de copies bas (31 % des isolats dans ce travail) suggèrent que les souches de *M. avium* devraient être typées par une deuxième méthode comme le PFGE (figure 6). Enfin, l'absence de génotype prédominant de *M. avium* chez les patients VIH+, pendant une période de 5 ans dans cette région tropicale, plaide contre l'existence d'une niche écologique spécifique de ces souches, mais suggère au contraire que des microépidémies de *M. avium* ont pu prédominer pendant des périodes de temps limitées.

## Perspectives

Une meilleure compréhension des bases moléculaires de la virulence du complexe *M. avium* ne pourra être apportée que par l'étude de la fonction des gènes. Différentes approches telles que le séquençage du génome complet de deux souches de *M. avium* ssp. *avium* (les souches 104 et ATCC 25291 par le TIGR, The Institute of Genomic Research, États-Unis, actuellement en cours d'achèvement) ou l'étude des relations entre la structure et la fonction des molécules, sont actuellement à l'étude. Cependant, pour mieux comprendre

les bases moléculaires de la transmission inter-espèces, il serait également souhaitable de séquencer des souches de *M. paratuberculosis* et *M. silvaticum* afin de comparer les séquences entre ces trois sous-espèces. De plus, grâce à l'inactivation des gènes à l'aide de la méthode dite de mutagenèse transcriptionnelle, les chercheurs sont maintenant en mesure de produire des mutants ayant perdu la capacité de se multiplier à l'intérieur des macrophages, et ainsi d'identifier les produits des gènes impliqués dans la survie intracellulaire de *M. avium* et d'étudier la stimulation de la production de différentes cytokines par les cellules immunitaires infectées avec ces mutants. Une caractérisation plus poussée des gènes de virulence de *M. avium* permettra l'identification de nouvelles cibles pour le développement d'antibiotiques, l'identification de gènes cibles pour des expériences d'inactivation de gènes permettant le développement de nouveaux vaccins vivants atténués et une augmentation de la compréhension des bases moléculaires de la virulence chez *M. avium* et plus généralement chez les mycobactéries. Il est également important de comprendre le rôle exact joué par les séquences d'insertion dans la virulence et la spécificité de l'hôte, par exemple le rôle de IS900 dans la dépendance à la mycobactine (42) et la croissance lente chez *M. paratuberculosis* ainsi que les protéines putatives codées par l'élément GS (66) dont la fonction exacte chez *M. paratuberculosis* et *M. silvaticum* reste à définir.

## Références bibliographiques

1. ABED Y, BOLLET C & DE MICCO P - Identification and strain differentiation of *Mycobacterium* species on the basis of DNA 16S-23S spacer region polymorphism. *Res Microbiol*, 1995, **146**, 405-413.
2. ARONSON T, HOLTZMAN A, GLOVER N, BOIAN M, FROMAN S *et al.* - Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**, 1008-1012.
3. BAESS I - Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B*, 1983, **91**, 201-206.
4. BELTAN E, HORGEN L & RASTOGI N - Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non pathogenic mycobacteria. *Microb Pathogen*, 2000, (sous- presse).
5. BIRKNESS KA, SWORDS WE, HUANG P-H, WHITE EH, DEZZUTI CS *et al.* - Observed differences in virulence-associated phenotypes between a human clinical isolate and a veterinary isolate of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*, 1999, **67**, 4895-4901.
6. BLOM-POTAR MC, DAVID HL & RASTOGI N - Isoenzymes profiles in slowly-growing and difficult-to-grow *Mycobacteria*. *Acta Leprogica*, 1989, **7** (suppl. 1), 48-49.
7. BÖDDINGHAUS B, ROGALL T, FLOHR T, BLÖCKER H & BÖTTGER EC - Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**, 1751-1759.
8. BONO M, JEMMI T, BERNASCONI C, BURKI D, TELENTI A & BODMER T - Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl Environment Microbiol*, 1995, **61**, 371-373.
9. BRENNAN PJ, ASPINALL GO & SHIN JE - Structure of the specific oligosaccharides from the glycopeptidolipid antigens of serovars in the *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex. *J Biol Chem*, 1981, **256**, 6817-6822.
10. BULL TJ, PAVLIK I, GARCIA MJ, SVASTOVA P, SUMAR N & TAYLOR JH - Strain of *Mycobacterium avium*, containing a new insertion sequence (IS1613, highly related to IS900) have an altered phenotype. 20th Annual Congress of the European Society for Mycobacteriology, Lucerne (Switzerland). *Ann. Congress ESM* 1999, **20**, 55.
11. CHEN ZH, BUTLER WR, BAUMSTARK BR & AHEARN DG - Identification and differentiation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by PCR. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 1267-1269.

12. CHIODINI RJ - CROHN'S Disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two diseases entities. *Clin Microbiol Rev*, 1989, **2**, 90-117.
13. CHIODINI RJ, VAN KRUININGEN HJ & MERKAL RS - Ruminant paratuberculosis (JOHNE'S disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet*, 1984, **74**, 218-262.
14. COVERT TC, RODGERS MR, REYES AL & STELMA JR G - Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**, 2492-2496.
15. DEVALLOIS A, PICARDEAU M, GOH KS, SOLA C, VINCENT V & RASTOGI N - Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**, 2756-2759.
16. DEVALLOIS A, PICARDEAU M, PARAMASIVAN CN, VINCENT V & RASTOGI N - Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in Accuprobe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16S rRNA gene sequencing, and DT1-DT6 PCR. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 2767-2772.
17. DEVALLOIS A & RASTOGI N - Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS1245 and IS1311 in a caribbean setting. *Res Microbiol*, 1997, **148**, 703-713.
18. DORAN TJ, DAVIES JK, RADFORD AJ & HODGSON ALM - Putative functional domain within ORF2 on the *Mycobacterium* insertion sequences IS900 and IS902. *Immunol Cell Biol*, 1994, **72**, 427-434.
19. DORAN T, TIZARD M, MILLAR D, FORD J, SUMAR N, LOUGHLIN M & HERMON-TAYLOR J - IS900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hed* gene. *Microbiology*, 1997, **143**, 547-552.
20. EATON T, FALKINHAM III JO & VON REYN CF - Recovery of *Mycobacterium avium* from cigarettes. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 2757-2758.
21. FRÉHEL C, DE CHASTELLIER C, LANG T & RASTOGI N - Evidence for inhibition of fusion of the lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*, 1986, **52**, 252-262.
22. FRÉHEL C, THOREL MF & RASTOGI N - Evidence that host-recycling of *Mycobacterium avium* preserves its ability to hinder macrophage killing functions. *Acta Leprologica*, 1989, **7** (suppl. 1), 160-163.
23. FROTHINGHAM R - Evolutionary bottlenecks in the agents of tuberculosis, leprosy, and paratuberculosis. *Med Hypotheses*, 1999, **52**, 95-99.
24. FROTHINGHAM R & WILSON KH - Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. *J Infect Dis*, 1994, **169**, 305-312.
25. GEORGE KL, PARKER BC, GRUFT H, FALKINHAM III JO - Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. *Am Rev Respir Dis*, 1980, **122**, 89-94.
26. GREEN EP, LIZARD MLV, MOSS MT, THOMPSON J, WINTERBOURNE DJ *et al.* - Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucl Acid Res*, 1989, **17**, 9063-9073.
27. GREIG A, STEVENSON K, HENDERSON D, PEREZ V, HUGHES V *et al.* - Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**, 1746-1751.
28. GUERRERO C, BERNASCONI C, BURKI D, BODMER T & TELENTI A - A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245 is a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 304-307.
29. HANCE AJ, GRANDCHAMPS B, LÉVY-FRÉBAULT V, LECOSSIER D, RAUZIER J *et al.* - Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol*, 1989, **3**, 843-849.
30. HERNANDEZ PEREZ M, FOMUKONG NG, HELLYER T, BROWN IN & DALE JW - Characterization of IS1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol*, 1994, **12**, 717-724.
31. INDERLIED CB, KEMPER CA & BERMUDEZ LEM - The *Mycobacterium avium* Complex. *Clin Microbiol Rev*, 1993, **6**, 266-310.
32. KOMIJN RE, DE HAAS PEW, SCHNEIDER MME, EGER T, NIEUWENHUIJS JHM *et al.* - Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in the Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**, 1254-1259.
33. KULSKI JK, KHINSOE C, PRYCE T & CHRISTIANSEN K - Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 668-674.
34. KUNZE ZM, WALL S, APPELBERG R, SILVA MT, PORTAELS F & MCFADDEN JJ - IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol*, 1991, **5**, 2265-2272.
35. LAPPAYAWICHIT P, RIENTHONG S, RIENTHONG D, CHUCHOTTA-WORN C, CHAIPRASERT A *et al.* - Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. *Tuberc Lung Dis*, 1996, **77**, 257-263.
36. LARI N, CAVALLINI M, RINDI L, IONA E, FATTORINI L & GARZELLI C - Typing of Human *Mycobacterium avium* isolates in Italy by IS1245-based restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 3694-3697.
37. LEÃO SC, BRIONES MRS, SIRCILI MP, BALIAN SC, MORES N & FERREIRA-NATO JS - Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variant in pig and human isolates from Brazil by PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**, 2592-2597.
38. LEGRAND E, SOLA C, VERDOL B & RASTOGI N - Genetic diversity of *Mycobacterium avium* recovered from AIDS patients in the caribbeans as studied by a consensus IS1245-RFLP method and pulsed-field gel electrophoresis. *Res Microbiol*, 2000, (sous-presses).
39. MAHILLON J & CHANDLER M - Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**, 725-774.
40. MARSH I, WHITTINGTON R & COUSINS D - PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol Cell Probes*, 1999, **13**, 115-126.
41. MOSS MT, MALIK ZP, TIZARD ML, GREEN EP, SANDERSON JD & HERMON-TAYLOR J - IS902, an insertion element of the chronic enteritis-causing *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**, 139-145.
42. NASER SA, GILLESPIE RF, NASER NA & EL-ZAATARI FAK - Effect of IS900 gene of *Mycobacterium paratuberculosis* on *Mycobacterium smegmatis*. *Curr Microbiol*, 1998, **37**, 373-379.
43. NISHIMORI K, EGUCHI M, NAKAOKA Y, ONODERA Y, ITO T & TANAKA K - Distribution of IS901 in strains of *Mycobacterium avium* complex from swine by using IS901-detecting primers that discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 2102-2106.
44. PRINZIS S, RIVOIRE B & BRENNAN. PJ - Search for the molecular basis of morphological variation in *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*, 1994, **62**, 1946-1951.
45. RASTOGI N - Mycobacteria as intracellular pathogens: current notions of pathogenicity, virulence, and drug resistance and their relation to effective therapy. In: RAOUL D (Eds) - *Antimicrobial agents pathogens*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 245-300.
46. RASTOGI N, BACHELET M & CARVALHO DE SOUSA JP - Intracellular growth of *Mycobacterium avium* in human macrophages is linked to the increased synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> and inhibition of the phagosome-lysosome fusions. *FEMS Microbiol Immunol*, 1992, **89**, 273-280.
47. RASTOGI N & BARROW WW - Laboratory and clinical aspects of the *Mycobacterium avium* epidemic: contributing factors associated with variability of drug susceptibility and immune responsiveness, and multifaceted nature of pathogenicity. *Res Microbiol*, 1994, **145**, 167-261.
48. RASTOGI N & DAVID HL - Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie*, 1988, **70**, 1101-1120.
49. RASTOGI N, FRÉHEL C, RYTER A, OHAYON H, LESOURD M & DAVID HL - Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: is the wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? *Antimicrob Agents Chemother*, 1981, **20**, 666-677.
50. RASTOGI N, GOH KS, WRIGHT E & BARROW WW - Potential targets for *Mycobacterium avium* defined by radiometric drug-inhibitor combination techniques. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, **38**, 2287-2295.
51. RASTOGI N, HELLIO R & DAVID HL - A new insight into the mycobacterial cell envelope architecture by the localization of antigens in ultrathin sections. *Zbl Bakt*, 1991, **275**, 287-302.
52. RITACCO V, KREMER K, VAN DER LAAN T, PIJNENBURG JEM, DE HAAS PEW & VAN SOOLINGEN D - Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1998, **2**, 242-251.

53. ROIZ MP, PALENQUE E, GUERRERO C & GARCIA MJ - Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* Strains. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 1389-1391.
54. ROTH A, FISHER M, HAMID ME, MICHALKE S, LUDWIG W & MAUCH H - Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 139-147.
55. SAITO H, TOMIOKA H, SATO K, TASAKA H & DAWSON DJ - Identification of Various Serovar Strains of *Mycobacterium avium* Complex by Using DNA Probes Specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**, 1694-1697.
56. SCHAEFER WB - Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am Rev Respir Dis*, 1965, **92**, 85-93.
57. SCHAEFER WB - Serologic identification of the atypical mycobacteria. *Bull Int Union Tuberc*, 1967, **39**, 59-64.
58. SHIRATSUCHUI H, TOOSI Z, METTLER MA & ELLNER JJ - Colonial morphotype as a determinant of cytokine expression by human monocytes infected with *Mycobacterium avium*. *J Immunol*, 1993, **150**, 2945-2954.
59. SOLA C, DEVALLOIS A, GOH KS, LEGRAND E & RASTOGI N - Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates from caribbean patients by DT1/DT6 PCR, nonradiative Southern hybridization, and the Accuprobe system. *Curr Microbiol*, 1996, **33**, 352-358.
60. SRITHARAN V, IRALU JV & BARKER Jr. RH - Specificity of diagnostic PCR amplification for *M. avium* using the probe pMAV22. *Mol Cell Probes*, 1995, **9**, 71-74.
61. STACKEBRANDT E & GOEBEL BM - Taxonomic note: a place of DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**, 846-849.
62. TELENTI A, MARCHESI F, BALZ M, BALLY F, BÖTTGER EC & BODMER T - Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 175-178.
63. THIERRY D, VINCENT V, CLEMENT F & GUESDON JL - Isolation of Specific DNA fragments of *Mycobacterium avium* and their possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 1048-1054.
64. THOREL MF, BLOM-POTAR MC & RASTOGI N - Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* and "wood-pigeon" mycobacteria by isoenzyme profile and selective staining of immunoprecipitates. *Res Microbiol*, 1990, **141**, 551-561.
65. THOREL M-F, KRICHEVSKY M & LÉVY-FRÉBAULT VV - Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1990, **40**, 254-260.
66. TIZARD M, BULL T, MILLAR D, DORAN T, MARTIN H *et al.* - A low G+C content genetic island in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* with homologous genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 1998, **144**, 3413-3423.
67. VAN SOOLINGEN D, BAUER J, RITACCO V, LEÃO SC, PAVLIK I *et al.* - IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 3051-3054.
68. VARNEROT A, CLÉMENT F & VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT V - Evaluation of nonradioactive DNA probes for the identification of *Mycobacterium avium* complex. *Met Molec Cell Biol*, 1992, **3**, 198-203.
69. VIA LE & FALKINGHAM III JO - *Genbank*, L10239. 1993.
70. VILJANEN MK, OLKKONEN L & KATILA M-L - Conventional Identification Characteristics, Mycolate and Fatty Acid Composition, and Clinical significance of MAIX AccuProbe-Positive Isolates of *Mycobacterium avium* Complex. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**, 1376-1378.
71. VON REYN CF, MASLOW JN, BARBER TW, FALKINGHAM III JO & ARBEIT RD - Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *The Lancet*, 1994, **343**, 1137-1141.
72. YAJKO DM, CHIN DP, GONZALEZ PC, NASSOS PS, HOPEWELL PC *et al.* - *Mycobacterium avium* complex in water, food, and soil samples collected from the environment of HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1995, **9**, 176-182.
73. YODER S, ARGUETA C, HOLTZMAN A, ARONSON T, BERLIN OG *et al.* - PCR Comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**, 2650-2653.