

Identification moléculaire des souches de mycobactéries

Gabriel AHOMBO^{1,2*}, John C. WILLISON², Etienne NGUIMBI¹, Rachel MOYEN¹,
Raoul AMPA¹ et Michel SATRE²

¹*Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques,
Université Marien NGOUABI, Brazzaville, Congo*

²*Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés. Département Dynamique et
Réponse Cellulaires C.E.A-Grenoble, France*

* Correspondance, courriel : ahombo@hotmail.com

Résumé

L'identification moléculaire des souches de mycobactéries disponibles dans notre laboratoire a été réalisée. L'amplification par PCR des gènes de hsp, ARNr16S, espaceurs intergéniques ARNr16S-23S suivie de l'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus avec les oligonucléotides Tb11 et Tb12, 248 et 42, Int16S et Int23S, révèle la constance dans la taille des fragments pour toutes les souches et par paire d'oligonucléotides. Ces résultats sont confirmés par la RFLP qui ne montre pas de différences significatives entre les différentes souches. Dans ce cas la discrimination des souches est difficile, on peut penser qu'il s'agit d'un seul genre. Par contre la taille des fragments obtenus avec les oligonucléotides H49 et H50, GyrAF et GyrAR permet de distinguer trois groupes de souches, les souches 6PY, C-8, C-18, et C-19 forment un premier groupe, les souches BHF004, C-20 et SPYR forment un deuxième groupe, et enfin la souche PYR-1 forme un troisième groupe.

Le séquençage et l'alignement multiple avec Clustal des séquences en comparaison d'une part avec *Mycobacterium gilvum* pour le premier groupe et d'autre part avec *Mycobacterium vanbaalenii* et *Mycobacterium austroafricanum* pour le deuxième groupe, confirment par le taux de similarité élevé (99-100%) cette classification. Un arbre phylogénétique basée sur les séquences partielles du gène hsp65, permet de situer les nouvelles par rapport aux autres mycobactéries. Cela corrobore bien avec nos résultats, tout en confirmant la cohérence de ces trois espèces dans le genre monophylétique *Mycobacterium*.

Mots-clés : *mycobactéries, oligonucléotides, amplification par PCR, séquençage, alignement multiple.*

Abstract

Molecular Identification of *Mycobacterium* strains

Molecular identification of available *mycobacterium* strains was hold in our laboratory. PCR amplification of genes for hsp, ARNr16S, intergenic spacer region of ARNr16S-23S, followed by agarose gel electrophoresis of DNA fragments resulted with the oligonucleotids Tb11 and Tb12, 248 and 42, Int16S and Int23S; revealed a constant size of the fragments for all the strains for each pair of nucleotids. These results were confirmed

by Random Fragment length polymorphism (RFLP) which could not give significant differences among strains for each pair of primers. In this case discrimination of strains by the only fragment size was difficult. On the other hand fragment size with the nucleotids H49 and H50 , GyrAF and GyrAR was helpful for discriminating strains ; three groups were distinguished : 6PY, C-8, C-18, et C-19 were in the first group ; BHF004, C-20 et SPYR were in the second group, and the only strains PYR-1 in the third group. Sequencing and multiple sequence alignment with Clustal of partial sequences of hsp65 gene of different strains in comparison with *Mycobacterium gilvum* for the first group; and with *Mycobacterium vanbaalenii* et *Mycobacterium austroafricanum* for the second group have confirmed by the high percentage of similarity (99-100%) the mentioned above classification. The based-partial sequences of hsp65 phylogenetic tree has located the new strains among other *mycobacteria*. These results are in harmony with the monophyletic group of *Mycobacterium*.

Keywords : *mycobactérium, oligonucleotids, amplification by PCR, sequencing, multiple alignment.*

1. Introduction

Le genre *Mycobacterium* est le seul représentant de la famille de *Mycobacteriaceae* de l'ordre des *Actinomycetales*. Il comprend des bactéries dont le génome à une teneur élevée en G et C (55à 70%) et dont la paroi contient des acides mycoliques, absent du règne bactérien à l'exception de quelques genres voisins (*Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus, Tsukamurella, Dietzia et Gordiana*) [1,2]. Les mycobactéries sont des bacilles aérobies stricts immobiles, asporulés et acapsulés. La présence d'acides mycoliques périétauux est responsable d'une propriété tinctoriale particulière : ce sont des bacilles acido-alkalo-résistants(BAAR) [3]. Les mycobacteries les plus courantes (notamment pour le BK) sont traditionnellement identifiées par des techniques phénotypiques. Cependant, l'identification moléculaire devient de plus en plus indispensable [4]. L'analyse de la séquence des gènes de l'ARN ribosomal 16S est devenue la règle d'or standard pour la discrimination taxonomique des bactéries. Ces séquences hautement conservées sont parfois incapables de donner suffisamment d'informations pour discriminer certaines espèces dans le genre ou encore des souches au sein d'une espèce [5,6]. L'amplification par PCR de la région intergénique entre 16S-23S de l'ADNr a permis de différencier des souches voisines [6]

Depuis l'avènement des techniques d'identification moléculaire, le genre *Mycobacterium* a connu une très grande évolution et comprend à ce jour 97 espèces [1,2]. Le séquençage de différentes cibles génomiques (*rrs, rpoB, gyrB, espace intergénique 16S-23S, hsp65*) permet quant à lui des identifications précises et rapides, nécessitant cependant l'accès à un séquenceur [2]. Ces techniques fondées sur l'analyse des séquences cibles précitées présentent des limites par l'absence de la différenciation des espèces du complexe *tuberculosis* Leurs séquences génomiques sont en effet identiques à 99,99%. Seule la séquence du gène *gyrB* présente quatre sites de polymorphisme naturel permettant la différenciation des espèces tuberculeuses [7]. La Technique de PCR-séquençage est devenue la méthode la plus fiable pour l'identification des mycobactéries grâce aux banques de données de plus en plus riches en séquences bactériennes [8,9]

Ce travail présente la caractérisation moléculaire de quelques souches de mycobactéries disponibles au laboratoire. Les gènes de : ARNr16S, région intergénique des espaceurs ARNr 16S-23S , gyrase ,hsp ont été amplifiés par PCR et séquencés. Des alignements multiples avec Clustal ont permis la comparaison des séquences qui montrent un taux de similarité élevé (99-100%) avec des séquences de références d'une part avec *Mycobactérium gilvum* et d'autre part avec *Mycobacterium austroafricanum* et *Mycobacterium vanbaalenii*, un arbre phylogénétique permet de situer les souches étudiées, tout cela est consistant avec un groupe monophylétique, le genre *mycobactérium*.

2. Matériel et Méthodes

2-1. Souches bactériennes et milieux de culture

Les souches de mycobactéries utilisées et disponibles au laboratoire sont les suivants : BF004, 6PY, C-8, C-18, C-19, C-20, PYR-1, SPYR, ces souches isolées et identifiées ne sont pas encore caractérisées sur le plan moléculaire et aussi non classifiées. Les souches ont été cultivées en utilisant les protocoles décrits par Kerstin Der et al [10] et Wayne et *al.* en 1986 [11]. La souche E.coli INVaF a été transformée.

2-2. Extraction d'ADN et Amplification par PCR des gènes

L'ADN des souches a été extraite selon Guillou et al. 1993 [12]. Toutes les PCR ont été effectuées en utilisant l'appareil T Personnel série 1409333 de Biometra Whatman. Tous les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés par Eurogentec S.A, ils sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Oligonucléotides et gènes correspondants utilisés pour les PCR

Gène à amplifier	Oligonucléotides utilisés
Fragment portant les inteins de la Gyrase A	H49: 5'-AGGTTGTGCGGCGGGATATTGGT-3' H50:5'-TTCGCCCCGACCGCAGCCACG-3' GyrAF :5'-CACCGCCGCTGTACGCGATG-3' Gyr AR:5'-GTGCGGCGCATGTTGGTGGCCAT-3'
Gène hsp	Tb11 : 5'-ACCAACGATGGTGTGTCAT-3' Tb12 : 5'-CTTGTCGAACCGCATAACCT-3'
Région intergénique des gènes de 16S –23S ARNr	Int16S :5'-TTGTACACACCGCCCGTCA-3' Int23S :5'-TGCCAAGGCATCCACCATG-3'
Fragment contenant les gènes de ARNr16s et de ARNr 23S	248 :5'-GTGTGGGTTTCCTTCCTTGG-3' 42 : 5'-CCACACGGGTTAACCTCGC-3'
Gène de l'ARNr16S	16SD:5'-AGCGGCGGTGTGTAG-3' 16SC: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'

Chaque PCR a comporté 30 cycles. Après une dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C chacun des cycles comprenait : une dénaturation pendant 2 minutes à 94°C, une hybridation pendant une minute à 55°C et une polymérisation pendant 3 minutes à 72°C, le dernier cycle est suivi d'une extension pendant 10 minutes à 72°C.

2-3. Electrophorèse des fragments d'ADN

L'électrophorèse des fragments d'ADN a été effectuée sur gel d'agarose en utilisant le tampon TBE et pour les fragments digérés le gel de polyacrylamide sur tampon TBE

2-4. Digestion, clonage et séquençage des fragments amplifiés

Les enzymes de restriction BstEII, HaeIII et RsaI ont été utilisées . Le clonage et la transformation ont été réalisés en utilisant les kits Invitrogen. La purification des plasmides a été réalisée en utilisant le kit Genomed et le séquençage des fragments effectués par Genome Express.

3. Résultats et discussion

Les résultats des amplifications par PCR des différents gènes sont consignés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Taille des fragments obtenus par PCR pour les souches de Mycobactéries utilisées dans cette étude

Souches Oligonucléotides	Taille des fragments							
	BHF004	6PY	C-8	C-18	C-19	C-20	Pyr-1	SPyr
H49 et H50	0,88kb et 0,41kb	-	-	-	-	0,88kb et 0,41kb	0,91kb et 0,41kb	0,88kb et 0,41kb
GyrAF et GyrAR	-	-	-	-	-	-	0,41kb	-
Tb11 et Tb12	0,44kb	0,44kb	0,44kb	0,44kb	0,44kb	0,44kb	0,44kb	0,44kb
248 et 42	1,7kb	1,7kb	1,7kb	1,7kb	1,7kb	1,7kb	1,7kb	1,7kb
Int16S et Int23S	0,62kb	0,62kb	0,62kb	0,62kb	0,62kb	0,62kb	0,62kb	0,62kb

Les résultats des différents PCR et ceux de la RFLP ont permis de montrer que :

Pour les oligonucléotides Tb11 et Tb12, 248 et 42, Int16S et Int23S, il y a une constance dans la taille des fragments issus de l'amplification par PCR pour toutes les souches et par paire d'oligonucléotides. Les tailles des fragments étant 0,44kb pour Tb11/Tb12, 1,7kb pour 248/42 et 0,62 kb pour Int16S/Int23S. Pour toutes ces souches la digestion enzymatique des différents fragments avec les enzymes de restriction BstEII, HaeIII et RsaI et ceci pour tous les oligonucléotides n'a pas présenté des différences significatives. Ces résultats montrent que la taille des fragments obtenus par amplification par PCR des gènes ; hsp, ARNr 16S, région intergénique 16S-23S ARNr, ARNr 23S, couplée à la digestion enzymatique ne permet pas de différencier les souches de la même espèce et non pas aussi les espèces du même genre.

Cependant, pour les oligonucléotides H49 et H50, on observe les résultats suivants : quatre (4) souches (6PY, C-8, C-18, et C-19) ne donne aucun fragment, 4 souches (BHF004, C-20, Pyr-1, SPyr) présentent chacune deux fragments, le fragment de 0,41kb est présent dans les quatre souches, trois souches (BHF004, C-20, SPyr) présentent un fragment de 0,88kb tandis que la souche Pyr-1 présente seule un fragment de 0,91kb. Pour les oligonucléotides GyrAF et GyrAR, seule la souche Pyr-1 présente un fragment de 0,41kb. Ces résultats ont permis d'identifier trois groupes de nouvelles souches ainsi répartis

- un groupe comportant les souches 6PY, C-8, C-18 et C-19
- un groupe comportant les souches BHF004, C-20 et SPyr
- un groupe comportant la souche Pyr-1.

L'analyse des résultats de l'alignement multiple avec Clustal **Figure 1** montre que le pourcentage de similarité pour des séquences étudiées pour les souches 6PY, C-8, C-18, C-19. est très élevé et compris entre 99-100%, ces séquences étant identiques laissent dire qu'il s'agit des souches de la même espèce, en comparaison avec *Mycobacterium gilvum*.

Alignment Report of M. gilvum/align, using Clustal method with Weighted residue weight table.
22 décembre 2003 12:57

Pa

Majority	A T G G T G T G T C C A T C G C C A A G G A G A T C G A G C T C G A G G A C C C																																							
	10										20										30										40									
5PY/65kDa/*	A T G G T G T G T C C A T C G C C A A G G A G A T C G A G C T C G A G G A C C C																																							
2-8/65kDa/*	A T G G T G T G T C C A T C G C C A A G G A G A T C G A G C T C G A G G A C C C																																							
2-18/65kDa/*	A T G G T G T G T C C A T C G C C A A G G A G A T C G A G C T C G A G G A C C C																																							
2-19/65kDa/*	A T G G T G T G T C C A T C G C C A A G G A G A T C G A G C T C G A G G A C C C																																							
4. gilvum 65 kDa/*	A T G G T G T G T C C A T C G C C A A G G A G A T C G A G C T C G A G G A C C C																																							
Majority	G T A C G A G A A G A T C G G C G C C G A G C T G G T C A A A G A G G T C G C C																																							
	50										60										70										80									
5PY/65kDa/*	G T A C G A G A A G A T C G G C G C C G A G C T G G T C A A A G A G G T C G C C																																							
2-8/65kDa/*	G T A C G A G A A G A T C G G C G C C G A G C T G G T C A A A G A G G T C G C C																																							
2-18/65kDa/*	G T A C G A G A A G A T C G G C G C C G A G C T G G T C A A A G A G G T C G C C																																							
2-19/65kDa/*	G T A C G A G A A G A T C G G C G C C G A G C T G G T C A A A G A G G T C G C C																																							
4. gilvum 65 kDa/*	G T A C G A G A A G A T C G G C G C C G A G C T G G T C A A A G A G G T C G C C																																							
Majority	A A G A A G A C C G A C G A C G T C G C A G G T G A C G G C A C C A C C A C C G																																							
	90										100										110										120									
5PY/65kDa/*	A A G A A G A C C G A C G A C G T C G C A G G T G A C G G C A C C A C C A C C G																																							
2-8/65kDa/*	A A G A A G A C C G A C G A C G T C G C A G G T G A C G G C A C C A C C A C C G																																							
2-18/65kDa/*	A A G A A G A C C G A C G A C G T C G C A G G T G A C G G C A C C A C C A C C G																																							
2-19/65kDa/*	A A G A A G A C C G A C G A C G T C G C A G G T G A C G G C A C C A C C A C C G																																							
4. gilvum 65 kDa/*	A A G A A G A C C G A C G A C G T C G C A G G T G A C G G C A C C A C C A C C G																																							
Majority	C C A C C G T G C T C G C C C A G G C G C T C G T T C G C G A A G G C C T G C G																																							
	130										140										150										160									
5PY/65kDa/*	C C A C C G T G C T C G C C C A G G C G C T C G T T C G C G A A G G C C T G C G																																							
2-8/65kDa/*	C C A C C G T G C T C G C C C A G G C G C T C G T T C G C G A A G G C C T G C G																																							
2-18/65kDa/*	C C A C C G T G C T C G C C C A G G C G C T C G T T C G C G A A G G C C T G C G																																							
2-19/65kDa/*	C C A C C G T G C T C G C C C A G G C G C T C G T T C G C G A A G G C C T G C G																																							
4. gilvum 65 kDa/*	C C A C C G T G C T C G C C C A G G C G C T C G T T C G C G A A G G C C T G C G																																							
Majority	C A A C G T G G C C G C G G C G C C A A C C C G C T C G G C C T C A A G C G C																																							
	170										180										190										200									
5PY/65kDa/*	C A A C G T G G C C G C G G C G C C A A C C C G C T C G G C C T C A A G C G C																																							
2-8/65kDa/*	C A A C G T G G C C G C G G C G C C A A C C C G C T C G G C C T C A A G C G C																																							
2-18/65kDa/*	C A A C G T G G C C G C G G C G C C A A C C C G C T C G G C C T C A A G C G C																																							
2-19/65kDa/*	C A A C G T G G C C G C G G C G C C A A C C C G C T C G G C C T C A A G C G C																																							
4. gilvum 65 kDa/*	C A A C G T G G C C G C G G C G C C A A C C C G C T C G G C C T C A A G C G C																																							
Majority	G G C A T C G A G A A G G C C G T C G A G G C C G T C A C C C A G G G T C T G C																																							
	210										220										230										240									
5PY/65kDa/*	G G C A T C G A G A A G G C C G T C G A G G C C G T C A C C C A G G G T C T G C																																							
2-8/65kDa/*	G G C A T C G A G A A G G C C G T C G A G G C C G T C A C C C A G G G T C T G C																																							
2-18/65kDa/*	G G C A T C G A G A A G G C C G T C G A G G C C G T C A C C C A G G G T C T G C																																							
2-19/65kDa/*	G G C A T C G A G A A G G C C G T C G A G G C C G T C A C C C A G G G T C T G C																																							
4. gilvum 65 kDa/*	G G C A T C G A G A A G G C C G T C G A G G C C G T C A C C C A G G G T C T G C																																							
Majority	T G A A G T C G G C C A A G G A G G T C G A G A C C A A G G A G C A G A T C G C																																							
	250										260										270										280									
5PY/65kDa/*	T G A A G T C G G C C A A G G A G G T C G A G A C C A A G G A G C A G A T C G C																																							
2-8/65kDa/*	T G A A G T C G G C C A A G G A G G T C G A G A C C A A G G A G C A G A T C G C																																							
2-18/65kDa/*	T G A A G T C G G C C A A G G A G G T C G A G A C C A A G G A G C A G A T C G C																																							
2-19/65kDa/*	T G A A G T C G G C C A A G G A G G T C G A G A C C A A G G A G C A G A T C G C																																							
4. gilvum 65 kDa/*	T G A A G T C G G C C A A G G A G G T C G A G A C C A A G G A G C A G A T C G C																																							
Majority	T G C C A C C G C C G C G A T C T C C G C C G G T G A C A C C C A G A T C G G C																																							
	290										300										310										320									
5PY/65kDa/*	T G C C A C C G C C G C G A T C T C C G C C G G T G A C A C C C A G A T C G G C																																							
2-8/65kDa/*	T G C C A C C G C C G C G A T C T C C G C C G G T G A C A C C C A G A T C G G C																																							
2-18/65kDa/*	T G C C A C C G C C G C G A T C T C C G C C G G T G A C A C C C A G A T C G G C																																							
2-19/65kDa/*	T G C C A C C G C C G C G A T C T C C G C C G G T G A C A C C C A G A T C G G C																																							
4. gilvum 65 kDa/*	T G C C A C C G C C G C G A T C T C C G C C G G T G A C A C C C A G A T C G G C																																							
Majority	G A G C T C A T C G C C G A G G C C A T G G A C A A G G T C G G C A A C G A G G																																							
	330										340										350										360									
5PY/65kDa/*	G A G C T C A T C G C C G A G G C C A T G G A C A A G G T C G G C A A C G A G G																																							
2-8/65kDa/*	G A G C T C A T C G C C G A G G C C A T G G A C A A G G T C G G C A A C G A G G																																							
2-18/65kDa/*	G A G C T C A T C G C C G A G G C C A T G G A C A A G G T C G G C A A C G A G G																																							
2-19/65kDa/*	G A G C T C A T C G C C G A G G C C A T G G A C A A G G T C G G C A A C G A G G																																							
4. gilvum 65 kDa/*	G A G C T C A T C G C C G A G G C C A T G G A C A A G G T C G G C A A C G A G G																																							

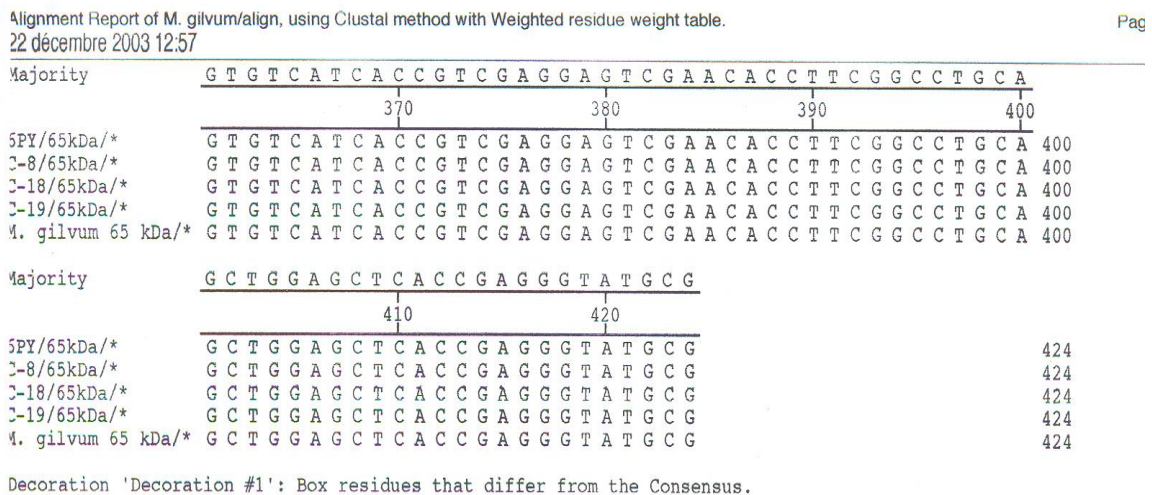


Figure 1 : alignement multiple avec Clustal pour les séquences des souches : 6PY; C-8; C-18; C-19 et la séquence de *Mycobacterium gilvum*

L'analyse des résultats de l'alignement multiple avec Clustal **Figure 2** montre que le pourcentage de similarité pour des séquences étudiées pour les souches BHF004, C-20, SPYR est très élevé et compris entre 99-100%, ces séquences appartiendraient aussi à la même espèce, en comparaison avec *Mycobacterium vanbaalenii* et *Mycobacterium austroafricanum*. Cependant la souche PYR-1 fait partie d'une autre espèce de Mycobactérie. Par cette étude trois nouvelles espèces de *mycobacterium* ont été identifiées, la classification de ces trois nouvelles espèces basée sur des séquences partielles du gène hsp65, par rapport aux autres espèces de *mycobactérium* est présentée dans l'arbre phylogénétique de la **Figure 3**.

La **Figure 3** permet de distinguer les souces **6PY ; C-8 ; C-18 ; C-19** (premier groupe) comme des taxons au niveau d'un nœud qui les sépare de *Mycobacterium gilvum*; les souches **BHF004 ; C-20 et Spyr** (deuxième groupe); comme des taxons ; elles sont situées avec *Mycobacterium Vanbaalenii*; ceci au niveau d'un nœud qui les sépare de *Mycobacterium austroafricanum* et enfin la souche **Pyr1**. Cet arbre de la **Figure 3** confirme également les résultats obtenus avec la taille des fragments

Alignment Report of M. austroafricanum/align, using Clustal method with Weighted residue weight table.
22 décembre 2003 13:01

Page 1

	A	T	G	G	T	G	T	G	T	C	C	A	T	C	G	C	C	A	A	G	G	A	G	A	T	C	G	A	G	C	T	G	G	A	G	G	A	T	C	C	Majority
	10										20										30										40										
1	A	T	G	G	T	G	T	G	T	C	C	A	T	C	G	C	C	A	A	G	G	A	G	A	T	C	G	A	G	C	T	G	G	A	G	G	A	T	C	C	BHF004/65kDa/*
1	A	T	G	G	T	G	T	G	T	C	C	A	T	C	G	C	C	A	A	G	G	A	G	A	T	C	G	A	G	C	T	G	G	A	G	G	A	T	C	C	C-20/65kDa/*
1	A	T	G	G	T	G	T	G	T	C	C	A	T	C	G	C	C	A	A	G	G	A	G	A	T	C	G	A	G	C	T	G	G	A	G	G	A	T	C	C	SPyr/65kDa/*
1	A	T	G	G	T	G	T	G	T	C	C	A	T	C	G	C	C	A	A	G	G	A	G	A	T	C	G	A	G	C	T	G	G	A	G	G	A	T	C	C	M. vanbaalenii/65kDa/*
1	A	T	G	G	T	G	T	G	T	C	C	A	T	C	G	C	C	A	A	G	G	A	G	A	T	C	G	A	G	C	T	G	G	A	G	G	A	T	C	C	M. austroafricanum/65 kDa/*
	50										60										70										80										
41	C	T	A	C	G	A	G	A	A	G	A	T	C	G	G	C	G	C	T	G	A	G	C	T	G	G	T	C	A	A	G	G	A	A	G	T	T	G	C	C	BHF004/65kDa/*
41	C	T	A	C	G	A	G	A	A	G	A	T	C	G	G	C	G	C	T	G	A	G	C	T	G	G	T	C	A	A	G	G	A	A	G	T	T	G	C	C	C-20/65kDa/*
41	C	T	A	C	G	A	G	A	A	G	A	T	C	G	G	C	G	C	T	G	A	G	C	T	G	G	T	C	A	A	G	G	A	A	G	T	T	G	C	C	SPyr/65kDa/*
41	C	T	A	C	G	A	G	A	A	G	A	T	C	G	G	C	G	C	T	G	A	G	C	T	G	G	T	C	A	A	G	G	A	A	G	T	T	G	C	C	M. vanbaalenii/65kDa/*
41	C	T	A	C	G	A	G	A	A	G	A	T	C	G	G	C	G	C	T	G	A	G	C	T	G	G	T	C	A	A	G	G	A	A	G	T	T	G	C	C	M. austroafricanum/65 kDa/*
	90										100										110										120										
31	A	A	G	A	A	G	A	C	T	G	A	C	G	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	G	A	C	G	G	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	BHF004/65kDa/*	
31	A	A	G	A	A	G	A	C	T	G	A	C	G	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	G	A	C	G	G	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	C-20/65kDa/*	
31	A	A	G	A	A	G	A	C	T	G	A	C	G	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	G	A	C	G	G	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	SPyr/65kDa/*	
31	A	A	G	A	A	G	A	C	T	G	A	C	G	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	G	A	C	G	G	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	M. vanbaalenii/65kDa/*	
31	A	A	G	A	A	G	A	C	T	G	A	C	G	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	G	A	C	G	G	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	M. austroafricanum/65 kDa/*	
	130										140										150										160										
121	C	C	A	C	C	G	T	G	C	T	C	G	C	A	C	A	G	G	C	G	C	T	G	G	T	C	C	G	T	G	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	BHF004/65kDa/*
121	C	C	A	C	C	G	T	G	C	T	C	G	C	A	C	A	G	G	C	G	C	T	G	G	T	C	C	G	T	G	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	C-20/65kDa/*
121	C	C	A	C	C	G	T	G	C	T	C	G	C	A	C	A	G	G	C	G	C	T	G	G	T	C	C	G	T	G	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	SPyr/65kDa/*
121	C	C	A	C	C	G	T	G	C	T	C	G	C	A	C	A	G	G	C	G	C	T	G	G	T	C	C	G	T	G	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	M. vanbaalenii/65kDa/*
121	C	C	A	C	C	G	T	G	C	T	C	G	C	A	C	A	G	G	C	G	C	T	G	G	T	C	C	G	T	G	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	M. austroafricanum/65 kDa/*
	170										180										190										200										
161	C	A	A	C	G	T	G	G	C	C	G	C	C	G	G	C	G	C	C	A	A	C	C	C	G	C	T	C	G	G	C	C	T	C	A	A	G	C	G	C	BHF004/65kDa/*
161	C	A	A	C	G	T	G	G	C	C	G	C	C	G	G	C	G	C	C	A	A	C	C	C	G	C	T	C	G	G	C	C	T	C	A	A	G	C	G	C	C-20/65kDa/*
161	C	A	A	C	G	T	G	G	C	C	G	C	C	G	G	C	G	C	C	A	A	C	C	C	G	C	T	C	G	G	C	C	T	C	A	A	G	C	G	C	SPyr/65kDa/*
161	C	A	A	C	G	T	G	G	C	C	G	C	C	G	G	C	G	C	C	A	A	C	C	C	G	C	T	C	G	G	C	C	T	C	A	A	G	C	G	C	M. vanbaalenii/65kDa/*
161	T	A	A	C	G	T	G	G	C	C	G	C	C	G	G	C	G	C	C	A	A	C	C	C	G	C	T	C	G	G	C	C	T	C	A	A	G	C	G	C	M. austroafricanum/65 kDa/*
	210										220										230										240										
201	G	G	C	A	T	C	G	A	G	A	A	G	G	C	C	G	T	C	G	A	G	A	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	G	A	C	G	C	T	G	C	BHF004/65kDa/*
201	G	G	C	A	T	C	G	A	G	A	A	G	G	C	C	G	T	C	G	A	G	A	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	G	A	C	G	C	T	G	C	C-20/65kDa/*
201	G	G	C	A	T	C	G	A	G	A	A	G	G	C	C	G	T	C	G	A	G	A	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	G	A	C	G	C	T	G	C	SPyr/65kDa/*
201	G	G	C	A	T	C	G	A	G	A	A	G	G	C	C	G	T	C	G	A	G	A	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	G	A	C	G	C	T	G	C	M. vanbaalenii/65kDa/*
201	G	G	C	A	T	C	G	A	G	A	A	G	G	C	C	G	T	C	G	A	G	A	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	G	A	C	G	C	T	G	C	M. austroafricanum/65 kDa/*
	250										260										270										280										
241	T	G	A	A	G	T	C	G	G	C	C	A	A	G	G	A	G	G	T	C	G	A	G	A	C	C	A	A	G	G	A	G	C	A	G	A	T	C	G	C	BHF004/65kDa/*
241	T	G	A	A	G	T	C	G	G	C	C	A	A	G	G	A	G	G	T	C	G	A	G	A	C	C	A	A	G	G	A	G	C	A	G	A	T	C	G	C	C-20/65kDa/*
241	T	G	A	A	G	T	C	G	G	C	C	A	A	G	G	A	G	G	T	C	G	A	G	A	C	C	A	A	G	G	A	G	C	A	G	A	T	C	G	C	SPyr/65kDa/*
241	T	G	A	A	G	T	C	G	G	C	C	A	A	G	G	A	G	G	T	C	G	A	G	A	C	C	A	A	G	G	A	G	C	A	G	A	T	C	G	C	M. vanbaalenii/65kDa/*
241	T	G	A	A	G	T	C	G	G	C	C	A	A	G	G	A	G	G	T	C	G	A	G	A	C	C	A	A	G	G	A	G	C	A	G	A	T	C	G	C	M. austroafricanum/65 kDa/*
	290										300										310										320										
281	T	G	C	C	A	C	C	G	C	C	G	C	G	A	T	C	T	C	G	G	C	C	G	G	C	G	A	C	A	C	C	C	A	G	A	T	C	G	G	C	BHF004/65kDa/*
281	T	G	C	C	A	C	C	G	C	C	G	C	G	A	T	C	T	C	G	G	C	C	G	G	C	G	A	C	A	C	C	C	A	G	A	T	C	G	G	C	C-20/65kDa/*
281	T	G	C	C	A	C	C	G	C	C	G	C	G	A	T	C	T	C	G	G	C	C	G	G	C	G	A	C	A	C	C	C	A	G	A	T	C	G	G	C	SPyr/65kDa/*
281	T	G	C	C	A	C	C	G	C	C	G	C	G	A	T	C	T	C	G	G	C	C	G	G	C	G	A	C	A	C	C	C	A	G	A	T	C	G	G	C	M. vanbaalenii/65kDa/*
281	T	G	C	C	A	C	C	G	C	C	G	C	G	A	T	C	T	C	G	G	C	C	G	G	C	G	A	C	A	C	C	C	A	G	A	T	C	G	G	C	M. austroafricanum/65 kDa/*
	330										340										350										360										
321	G	A	G	C	T	C	A	T	C	G	C	C	G	A	G	G	C	C	A	T	G	G	A	C	A	A	G	G	T	C	G	G	C	A	A	C	G	A	G	G	BHF004/65kDa/*
321	G	A	G	C	T	C	A	T	C	G	C	C	G	A	G	G	C	C	A	T	G	G	A	C	A	A	G	G	T	C	G	G	C	A	A	C	G	A	G	G	C-20/65kDa/*
321	G	A	G	C	T	C	A	T	C	G	C	C	G	A	G	G	C	C	A	T	G	G	A	C	A	A	G	G	T	C	G	G	C	A	A	C	G	A	G	G	SPyr/65kDa/*
321	G	A	G	C	T	C	A	T	C	G	C	C	G	A	G	G	C	C	A	T	G	G	A	C	A	A	G	G	T	C	G	G	C	A	A	C	G	A	G	G	M. vanbaalenii/65kDa/*
321	G	A	G	C	T	C	A	T	C	G	C	C	G	A	G	G	C	C	A	T	G	G	A	C	A	A	G	G	T	C	G	G	C	A	A	C	G	A	G	G	M. austroafricanum/65 kDa/*

Alignment Report of M. austroafricanum/align, using Clustal method with Weighted residue weight table.
22 décembre 2003 13:01

Page 2

	G T G T C A T C A C C G T C G A G G A G A G C A A C A C C T T C G G C C T G C A	Majority
	370 380 390 400	
361	G T G T C A T C A C C G T C G A G G A G A G C A A C A C C T T C G G C C T G C A	BHF004/65kDa/*
361	G T G T C A T C A C C G T C G A G G A G A G C A A C A C C T T C G G C C T G C A	C-20/65kDa/*
361	G T G T C A T C A C C G T C G A G G A G A G C A A C A C C T T C G G C C T G C A	SPyr/65kDa/*
361	G T G T C A T C A C C G T C G A G G A G A G C A A C A C C T T C G G C C T G C A	M. vanbaalenii/65kDa/*
	G C T C G A G C T C A C C G A G G G T A T G C G	Majority
	410 420	
401	G C T C G A G C T C A C C G A G G G T A T G C G	BHF004/65kDa/*
401	G C T C G A G C T C A C C G A G G G T A T G C G	C-20/65kDa/*
401	G C T C G A G C T C A C C G A G G G T A T G C G	SPyr/65kDa/*
401	G C T C G A G C T C A C C G A G G G T A T G C G	M. vanbaalenii/65kDa/*
401	G C T C G A G C T C A C C G A G G G T A T G C G	M. austroafricanum/65 kDa/*

Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from the Consensus.

Figure 2 : Résultats de l'alignement multiple avec Clustal pour les séquences des souches : BHF004 ; C-20 et SPYR et les séquences de *Mycobacterium vanbaalenii* et *Mycobacterium austroafricanum*

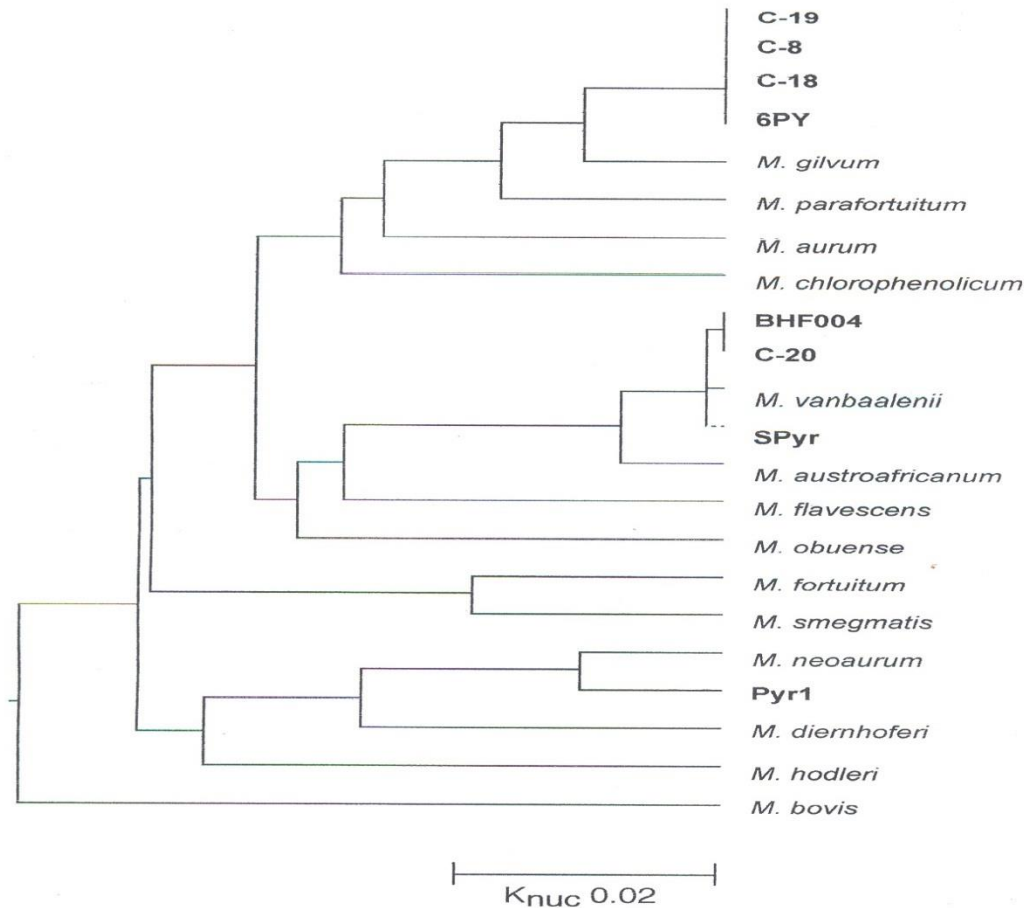


Figure 3 : Arbre phylogénétique des souches du genre *Mycobacterium* isolées au Laboratoire et des espèces apparentées ; basé sur les séquences partielles du gène *hsp65*

En général pour les souches de la même espèce, le taux de similarité est presque compris entre 99 et 100%, pour les séquences de l'ADNr 16S, dans ces conditions on utilise les espaceurs intergéniques de l'ADNr compris entre 16S et 23S.[5,6] Les résultats du séquençage de ces espaceurs peuvent ou ne pas discriminer les souches de la même espèce. Si le taux de similarité est supérieur à 97 ou 98%, la discrimination est difficile. Par contre si le taux de similarité au niveau des séquences des espaceurs est inférieure à 97%, la discrimination est possible est plus aisée. Il est annoté que les séquences des espaceurs codent pour les ARN de transfert et trois cas sont possibles, soit deux ARNt, soit un seul, soit enfin aucun et selon le cas, il y a une diversité des séquences des espaceurs [6]

4. Conclusion

L'identification moléculaire des souches de mycobactéries de notre laboratoire par PCR, en utilisant trois types d'oligonucléotides amplifiant :

- les inteims de la gyrase ;
- le gène de thermosensibilité hsp 65
- la région intergénique 16S et 23S

a permis de révéler les fragments de taille constante dans les mycobactéries étudiées. Quatre types de fragments de taille constante, spécifique pour chaque oligonucléotide ont été trouvés. La taille des fragments étant la même pour chaque oligonucléotide utilisé chez toutes les mycobactéries, nous pouvons déduire que ces oligonucléotides sont un outil important dans le diagnostic et l'identification des mycobactéries. Nous avons pu classer nos souches en trois groupes :

- un groupe proche de *Mycobacterium gilvum* ;
- un groupe proche de *Mycobacterium vanbaalenii* ;
- et un groupe proche de *Mycobacterium neoaurum*.

Références

- [1] - E. Tortoli. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* (2003); 16 319-54.
- [2] - Cattoir. Identification moléculaire des mycobactéries et detection de la résistance aux antibiotiques. *Ann Biol Clin vol 62 (4)* (2004); 405-413
- [3] - B. G. Metchock , Notte FS, Wallace RJ Jr *Mycobacterium*. *Manual of clinical microbiology*. 7 th edition . Washington DC:American society for microbiology (2001): 399-437.
- [4] - J. Maugein, C. Bébéar. Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. *Med Mal Infect 33* (2003) ;153s-8s.
- [5] - G. E Fox,, Wisotzkey, J. D., Jurtschuk Jr, P.: How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 (1992);166–170
- [6] - E. Nguimbi, Y. Z Li, B.I. Gao, Z. F. Li, B. Wang, Z. H. Wu, B. X. Yan, Y. B. Qu, and P. J. Gao. 16S–23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Regions in Cellulolytic Myxobacteria and Differentiation of Closely Related Strains *System. Appl. Microbiol.* 26, 262–268 (2003).

- [7] - H. Kassai , T. Ezaki , S. Harayama. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences *J Clin Microbiol* (2000); 38:301-8
- [8] - J. L. Cloud, H. Neal, R. Rosenberry . Identification of *Mycobacterium spp.*, by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing Kit and additional sequencing libraries *J Clin Microbiol* (2002); 40: 400-6
- [9] - G. Devulder , G. Pierriere, F. Baty, J. P. Flandrois. BIBI. A Bioinformatics bacterial identification tool *J Clin Microbiol* (2003); 41:1785-7.
- [10] - D. Kerstin, K. Ulrich, S. Ingolf, S. Erko, and R. M. Kroppenstedt. *Mycobacterium pyrenivorans* sp. Nov.; a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004); 54; 23: 3-23 7
- [11] - G. Wayne I, P. kubicag. The mycobacteria. In *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1435-1457 (1986).
- [12] - J.P. Guillou, S. Hénault, A. Ostyn et F.Thorel. Utilisation de la méthode d'Amplification enzymatique in vitro pour la détection de *Mycobacterium paratuberculosis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. ;* (1993); 12(2); 605-615
- [13] - Cai L. Chen Zhao T. Ding BC. Zhang JZ. Identification of Mycobacterium 65 kD heat shock protein gene by polymerase chain reaction analysis from lesions of swimming pool granuloma *Clin Med J (Engl)*(2006) 119(1) 43-48
- [14] - Jeanne Maugein Identification moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses *Revue Francophone des Laboratoires Volume 2007 Issue 391 57-62*
- [15] - E Castellanos. A Aranaz. B. Romero. L de Juan. J Alvarez. J Bezos. S Rodriguez. K Stevenson. A Mateos and L Dominguez Polymorphism in gyrA and gyrB Genes among *Mycobacterium avium subsp.* Paratuberculosis Type I, II and III isolates. *J Clin Microbiol* (2007) 45 (10) 3439-3442
- [16] - E Castellanos , A Aranaz and J De Buck Rapid Identification and Differentiation of *Mycobacterium avium subspecies* paratuberculosis Types by Use of Real Time PCR High-Resolution Melt Analysis of the MAP1506 Locus *J Clin Microbiol* (2010) 48(4) 1474-1477
- [17] - Nicolas Veziris Rapid Molecular Detection of tuberculosis and Rifampicine resistance *The New England Journal of Medecine* (2010) Volume 363 (11)
- [18] - Anamika Singh and Vijendra Kumar Kashyap Specific and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples by Diseases *Interdiscip Perspect Infect Dis Volume 2012* (2012) 654694
- [19] - Nosova EY, Bukatina AA, Isaeva YD et al. Analysis of mutations in the gyrA and gyrB genes and their association with the resistance of mycobacterium tuberculosis to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin *J Med Microbiol* (2013) 62 108-113