MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
Présenté
Par

De Cruz Krystel

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Développement et mise en place d'un système de détection moléculaire pour la tuberculose bovine

Soutenu le 11/12/17 **devant le jury suivant :**

Dr Chabert Michèle - Présidente
Dr Raskine Laurent – Rapporteur
Dr Biet Franck – Examinateur
Dr Boschiroli Maria-Laura – Tutrice scientifique
Dr Neildez Thi My Anh – Tutrice pédagogique

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Boschiroli María Laura et de Dr Neildez Thi My Anh

Intitulé de la structure d'accueil : *Unité Zoonoses Bactériennes, Laboratoire de Santé Animale de Maisons Alfort, Anses*
Directeur : *Boireau Pascal*

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : *Laboratoire de biologie moléculaire Inserm U951 Généthon*
Directeur : *Pr Paldi Andras*

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
Présenté
Par

De Cruz Krystel

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Développement et mise en place d'un système de détection moléculaire pour la tuberculose bovine

Soutenu le 11/12/17 **devant le jury suivant :**

Dr Chabert Michèle - Présidente
Dr Raskine Laurent – Rapporteur
Dr Biet Franck – Examinateur
Dr Boschiroli Maria-Laura – Tutrice scientifique
Dr Neildez Thi My Anh – Tutrice pédagogique

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Boschiroli María Laura et de Dr Neildez Thi My Anh

Intitulé de la structure d'accueil : *Unité Zoonoses Bactériennes, Laboratoire de Santé Animale de Maisons Alfort, Anses*
Directeur : *Boireau Pascal*

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : *Laboratoire de biologie moléculaire Inserm U951 Généthon*
Directeur : *Pr Paldi Andras*

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'**ANSES**, de m'avoir permis de réaliser ce diplôme et notamment **Pascal Boireau** le directeur du laboratoire de santé animale.

Egalement, je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Maria-Laura Boschiroli** pour sa patience, sa bienveillance, sa confiance et son soutien indéfectible, tant dans la réalisation de ce projet que dans ma construction professionnelle et personnelle. Tous mes remerciements à **Thi My Anh Neildez**, pour ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie tous les membres du jury, **Mme Michèle Chabert** qui a accepté de présider le jury, **Laurent Raskine** qui m'a fait l'honneur de lire mes travaux et **Franck Biet** pour sa participation. Merci de permettre aujourd'hui l'aboutissement de mon travail.

Un grand merci également à toute l'équipe, avec laquelle je vis des moments intenses, **Sylvie Hénault**, **Lorraine Michelet** et **Jennifer Tambosco**. Je pense aussi aux anciens qui ont fait partie de cette aventure **Claudine Karoui**, **Tabatha Bulach**, **Yohann Phalente** et **Benjamin le Bihan**.

Aux directrices de mon unité, **Claire Ponsart** et **Karine Laroucau**, merci pour votre soutien, votre temps et votre confiance dans la réalisation de ce projet et dans ma construction professionnelle. Je remercie également toutes les personnes de mon unité, **Christiane** et ses gâteaux, **Madeleine** et son accent pétillant, **Rébiha**, **Rachid**, **Cécile**, **Claire B**, **Thomas**, **Benoit**, **Nora**, **Virgine** et sa douce voix et **Maryne**.

Quant aux autres, un profond remerciement pour ces moments si improbables, **Guillaume** (le burro catalan), **Fabien** (la mouffette), **Yannick** (le bouc), **Antoine** (cassé de partout), **Ludivine** (la colombe), **Vincent** (le sanglier), **Ali** (le lion devenu lionceau), **Marion** (la dodo), **Bérénice** (la rigolote), **Maellys** (la folle), **Yohann** (le poulet), **Tabatha** (l'autre folle) et **Amandine** (la chinoise). Je pense également aux vieux **Aleksandar** (ne pas toucher AZ), **Simon** (Timon) et **Nicolas** (alias Topette). Merci à tous pour votre soutien moral, vos frasques et vos bizarreries que j'adore !

Et enfin, le meilleur pour la fin, je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma famille, ma petite sœur **Céline,** mes parents **Félix** et **Elena**, mais également **Aurore** gros bisous !

Table des matières

Liste des Tableaux **1**

Liste des figures **2**

Liste des annexes **3**

Liste des abréviations **4**

Chapitre 1 : Contexte bibliographique **7**

I. Introduction générale **7**

1. Découverte des mycobactéries d'importance en santé publique 8

2. Ecologie des mycobactéries 8

3. Classification des mycobactéries 9

4. Caractéristiques générales des mycobactéries 10

a. Morphologie 10

b. Autres formes de résistance 12

c. Caractéristiques culturales et phénotypiques 12

d. Phylogénie du genre *Mycobacterium* 14

i. Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) 15

ii. Phylogénie des mycobactéries du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) 18

- Les lignées humaines du MTBC 19
- Les lignées animales du MTBC 20

e. Identification des mycobactéries 21

i. Caractérisation phénotypique 21

ii. Caractérisation moléculaire 23

II. Physiopathologie et épidémiologie de la tuberculose bovine 25

1. La tuberculose bovine : signes cliniques 25

2. Réservoirs de la tuberculose bovine 26

a. *M. bovis*, un agent pathogène multi-hôte 26

b. Hôtes et statut épidémiologique 26

3. Tuberculose bovine dans la faune sauvage 26

4. La tuberculose bovine en élevage 28

a. Les voies de contamination 28
b. Facteurs de risques liés à l'élevage 29

5. Circulation de *M. bovis* dans l'environnement 30
a. Sources de contamination 30
b. Survie de *M. bovis* dans l'environnement 30
c. La faune du sol 31

III. Dépistage et diagnostic de la tuberculose bovine chez les bovins 32

1. Surveillance de la tuberculose bovine 32
a. Définition des cas 32
b. Dispositif de surveillance 32
c. Gestion des suspicions 33

2. Les outils de 1ère intention ante mortem 35
a. Les intradermotuberculinations (IDT) 35
b. Le dosage de l'interféron gamma 36

3. Tests post mortem de 1ère intention utilisés en France 37
a. L'histologie 37
b. La bactériologie 37
c. La PCR 38

4. Situation des élevages bovins 38

IV. Surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage 39

V. Typage moléculaire du MTBC 40

1. Le spoligotypage 41
a. CRISPR 41
b. Le génotypage via le spoligotypage 41
c. Méthodes de spoligotypage 42
i. Spoligotypage en macro-arrays sur membrane 43
ii. Spoligotypage en micro-arrays en phase solide 44
iii. Spoligotypage en micro-arrays en phase liquide 44
- Le Bio-plex 200 (Bio-Rad) 44
- Révélation en phase liquide 45
d. Situation en Europe 46
e. Situation en France 46

2. Le typage VNTR ou MLVA 47

3. Diversité génétique des souches de *M. bovis* françaises 47

Chapitre 2 : Objectifs 50

I. Problématique 50

II. Projet d'étude 50

Chapitre 3 : Développement des systèmes de détection et de typage moléculaire pour la TB 53

I. Matériel et méthodes 53

1. Échantillons utilisés et extraction 53
   a. Extraction d'ADN de souches 53
   b. Extraction d'ADN sur prélèvement 54

2. Mise en place de la PCR en temps réel 54
   a. Design des oligonucléotides 54
   b. Choix des cibles 55
   c. Protocole expérimental 56

3. Mise en place du protocole de spoligotypage 57
   a. Protocole expérimental 57

II. Résultats et Discussion 59

1. Validation des PCR 59
   a. Notion de spécificité expérimentale inclusive (Sp inclusive) 59
   b. Notion de spécificité expérimentale exclusive (Sp exclusive) 59
   c. Notion de limite de détection 59
   d. Résultats de la validation 61
   e. Conclusion 63

2. Validation de la méthode de spoligotypage par luminex 63
   a. Analyse des résultats 63
   b. Interprétation du spoligotypage 65

3. Évaluation des performances des méthodes développées 66
   a. Performances du spoligotypage 66
   b. Performances du système de détection et du typage utilisé au LNR 68
   c. Conclusion 69

Chapitre 4 : Applications des méthodes mises en place pour la discrimination du MTBC ... 71

I. Mise en évidence de la circulation de la souche vaccinale dans les tissus de blaireaux pour une mise en place d'un vaccin oral chez le blaireau en Europe ... 71

1. Contexte ... 71
2. Matériel et méthode ... 71
3. Résultats ... 72
4. Conclusion ... 73

II. Mise en évidence de *M. bovis* dans l'environnement ... 74

1. Contexte ... 74
2. Matériel et méthodes ... 74
3. Résultats ... 76
4. Conclusion ... 76

III. Mise en évidence des infections animales à *Mycobacterium microti* ... 77

1. Contexte ... 77
2. Matériel et méthodes ... 77
3. Résultats et discussion ... 78
4. Conclusion ... 79

Chapitre 5 : Applications des méthodes mises en place pour la discrimination des MNT ... 81

I. Le cas des échantillons Histologie +/ PCR – ... 81

1. Contexte ... 81
2. Matériel et méthode ... 82
3. Résultats ... 82
4. Conclusion ... 83

II. Caractérisation des souches de mycobactéries non tuberculeuses qui peuvent générer des résultats non spécifiques aux tests ante-mortem ... 83

1. Contexte 83

2. Analyse de l'identité des MNT qui interfèrent dans le diagnostic de la TB 84
a. Matériel et méthodes 84
b. Résultats 84
i. Évolution de l'identification des souches de mycobactéries lors du diagnostic de la tuberculose bovine 84
ii. Identification des mycobactéries non tuberculeuse qui interfèrent dans le diagnostic 86
c. Conclusion 86

3. Répartition géographique des mycobactéries atypiques en France 87
a. Matériel et méthodes 87
b. Résultats 87
c. Conclusion 87

4. Étude de la prévalence de *M. avium* spp et *M. nonchromogenicum* 89
a. Matériel et méthode 89
b. Résultats 89
c. Conclusion 90

5. Étude de l'impact de la forte prévalence de *M. nonchromogenicum* et *M. avium* spp sur les tests de 1ère intention ante-mortem 91
a. Matériel et méthode 91
b. Résultats 91
c. Conclusion 92

6. Conclusion globale 92

Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives 93

Chapitre 7 : Bibliographie 97

Annexes : 104

Liste des Tableaux

Titre des tableaux	Page
Tableau 1 : Classification des mycobactéries de par leurs caractéristiques de croissance (Runyon 1965)	9
Tableau 2 : Classification des mycobactéries selon leur pathogénicité	10
Tableau 3 : Principales caractéristiques aux tests biochimiques pour la discrimination des mycobactéries à croissance lente (Tortoli, 2003)	21
Tableau 4 : Distribution des différents types d'acides mycoliques de mycobactéries	22
Tableau 5 : Utilisation de gènes de ménage pour l'identification de mycobactéries	23
Tableau 6 : Exemple de RD utilisées pour la discrimination du MTBC	24
Tableau 7 : Facteurs impliqués dans la circulation de *M. bovis* dans la faune sauvage	27
Tableau 8 : Survie de *M. bovis* dans l'environnement	31
Tableau 9 : Spécificité et sensibilité des tests utilisés dans le diagnostic de la TB	36
Tableau 10 : Profils spoligotypiques du MTBC	42
Tableau 11 : Tableau des cibles utilisées	55
Tableau 12 : Choix des souches pour l'étude de la Spp inclusive	60
Tableau 13 : Tableau récapitulatif des paramètres des PCR mises en place	62
Tableau 14 : Interprétation des résultats de spoligotypage	65
Tableau 15 : Évaluation de la sensibilité du spoligotypage sur la faune sauvage	66
Tableau 16 : Évaluation de la sensibilité du spoligotypage	68
Tableau 17 : Catégorisation des performances du système de détection et de typage du LNR	68
Tableau 18 : Détection de la souche vaccinale sur les prélèvements analysés par bactériologie et par PCR	73
Tableau 19 : Proportion de *M. microti* dans la faune sauvage	79
Tableau 20: Bactéries identifiées par séquençage	79
Tableau 21 : Tableau de diagnostic différentiel	82
Tableau 22 : Identification des MNT présentes dans le diagnostic de la tuberculose bovine	84
Tableau 23 : Etude de la proportion de *M. avium* spp et *M. nonchromogenicum* dans la faune sauvage et chez les bovins	90
Tableau 24a : Etude de l'impact de *M. avium spp* et *M. nonchromogenicum* sur les tests de 1ère intention	91
Tableau 24b : Etude de l'impact de *M. avium* et *M. nonchromogenicum* sur les tests de 1ère intention	91

Liste des figures

Titres des figures (1/2)	Page
Figure 1 : Constitution de la paroi mycobactérienne	11
Figure 2a : Arbre phylogénétique, basé sur le gène de l'ARNr 16S, comprenant les espèces représentatives de mycobactéries à croissance rapide	13
Figure 2b : Arbre phylogénétique, basé sur le gène de l'ARNr 16S, comprenant les espèces représentatives de mycobactéries à croissance lente	13
Figure 3 : Arbre phylogénétique des actinomycètes	14
Figure 4 : Phylogénie du complexe *Mycobacterium avium*	17
Figure 5 : Arbre phylogénétique du complexe *Mycobacterium terrae*	17
Figure 6 : Phylogénie des souches du MTBC basée sur les « Regions of Differences » et différents « Single Nucleotide Polymorphism »	18
Figure 7a : Lésion caséeuse sur un ganglion rétro-pharyngien	25
Figure 7b : Lésion caséeuse sur un ganglion médiastinal	25
Figure 8a : Rythmes de dépistage prophylactique de la tuberculose bovine par département en 2014	33
Figure 8b : Taux d'élevages bovins tuberculinés par commune en France en 2013 dans le cadre des campagnes annuelles de dépistage prophylactique	33
Figure 9 : Acteurs de la lutte contre la TB	34
Figure 10 : Schéma de la réponse immunitaire chez le bovin infecté en lien avec les tests de dépistage de la tuberculose bovine	35
Figure 11 : Évolution de la prévalence et de l'incidence de la tuberculose bovine de 1995 à 2016	39
Figure 12 : Modalité de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage	40
Figure 13 : Principe de l'amplification du spoligotypage	43
Figure 14a : Hybridation sur membrane	43
Figure 14b : Résultats du spoligotypage sur membrane	43
Figure 15 : Puce micro-arrays	44
Figure 16 : Le bio plex 200	45
Figure 17a : Répartition géographique du complexe Eu1 en Europe	46
Figure 17b : Répartition géographique du complexe Eu2 en Europe de l'Ouest	46
Figure 18 : Répartition géographique des 3 profils spoligotypes prédominants en France	47
Figure 19 : Distribution du nombre de génotypes en fonction du temps en France	48
Figure 20 : Minimun spanning tree réalisé avec 2 332 souches de *M. bovis* isolées entre 1978 et 2013	49
Figure 21: Protocole de la PCR en temps réel	56
Figure 22 : Protocole expérimental du spoligotypage sur micro-arrays en phase liquide	58
Figure 23 : Détermination du seuil de positivité sur les données brutes du Luminex	64
Figure 24 : Résultats de fluorescence brute d'une souche	64
Figure 25: Distribution des foyers cumulatifs de TB chez les bovins en France (image dans l'insert ci-dessus) et par commune en Côte d'Or de 2005 à 2013	75

Liste des figures

Titres des figures (2/2)	Page
Figure 26 : Résultats du spoligotypage d'échantillons d'ADN extraits de matrices environnementales	76
Figure 27 : Localisation des profils spoligotype de *M. microti*	78
Figure 28 : Arbre phylogénétique des spoligotypes de *M. microti*	78
Figure 29 : Schéma diagnostic de la tuberculose bovine à la suite de la découverte de lésions à l'abattoir	81
Figure 30 : Répartition des MNT dans le diagnostic de la tuberculose bovine	85
Figure 31 : Répartition géographique de *M. bovis* au sein des cheptels bovins (2012-2016)	88
Figure 32 : Répartition géographique de mycobactéries atypiques au sein des cheptels bovins (2012-2016)	88

Liste des annexes

Titre des annexes	Page
Annexe 1 : Alignement des séquences du gène *hsp65* / Design des oligonucléotides	105
Annexe 2 : Alignement des séquences du gène *IS1245* / Design des oligonucléotides	106
Annexe 3 : Alignement des séquences du gène RD1 / Design des oligonucléotides	107
Annexe 4 : Etude de l'effet matrice sur les PCR et choix du master mix	108
Annexe 5 : Etude préliminaire des couples d'oligonucléotides pour la détection de *M. spp*	108
Annexe 6 : Etude préliminaire des couples d'oligonucléotides pour la détection de *M. nonchromogenicum*	109
Annexe 7 : Etude préliminaire des couples d'oligonucléotides pour la détection de *M. bovis*^{BCG} et de *M. avium spp*	110
Annexe 8 : Résultats de la spécificité inclusive	111
Annexe 9 : Résultats de la spécificité exclusive	112
Annexe 10 : Résultats de la détermination de la LD95 des cibles pour la discrimination des MNT	113
Annexe 11 : Résultats de la détermination de la LD95 des cibles pour la discrimination des MTBC	114

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANSES : Agence de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

APHA : Animal and plant health agency

APMS : Arrêté préfectoral de mise sous surveillance

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

BAAR : Bacille acido-alcoolo résistant

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

CFP 10 : ***Culture filtrate antigen 10kDa***

CRISPR : ***Clustered Regulary Interspeced Short Palindromic Repeats***

DGAL : Direction générale de l'alimentation

DR : ***Direct repeat***

DDecPP : Direction départementale en charge de la protection des populations

ELISA : ***Enzyme-Linked Immunosrbent Assays***

ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

ESAT 6 : ***Early secretory antigenic target 6 kDa***

Eu : ***European***

HPO : Huile d'arachide hydrogénée

HSR : Hypersensibilité retardée

IDC : Intradermotuberculination comparative

IDS : Intradermotuberculination simple

IDT : Intradermotuberculination

INFɣ : Interféron gamma

IPC : ***Internal positi**ve* **control***

LD95 : Limite de détection à 95%

LDpcr : Limite de détection

LNR : Laboratoire national de référence

LVD : Laboratoire vétérinaire départemental

MAC : ***Mycobacterium avium complex***

MAP : ***Mycobacterium avium paratuberculosis***

MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuses

MTBC: ***Mycobacterium tuberculosis complex***

MTeC : Complexe terrae

OIT : Officiellement indemne de tuberculose

ONCFS : Office national de la chasse et de la faune sauvage

PCR : ***Polymerase chain reaction***

PPD : Protéines Purifiées Dérivatives

RD : Région de différence

RI : Réponse immunitaire

SAPE : Streptavidine Phycoerythrine

Se : Sensibilité

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

Sp : Spécificité

TB : Tuberculose bovine

TbD1 : ***Tuberculose deletion 1***

UF : Unité de fluorescence

UPEC : Université Paris-Est Créteil

UV : Ultra-Violet

VNTR: ***Variable number tandem repeat***

MLVA : ***Multi locus VNTR analysis***

WGS : ***Whole genome sequencing***

Chapitre 1 : Contexte bibliographique

I. Introduction générale

La tuberculose bovine (TB) est une maladie de catégorie 1 selon l'avis de l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) : *maladies justifiant un engagement financier et humain de l'Etat sur des actions de surveillance et éventuellement de lutte (ou de maîtrise) en élevage*. Elle est provoquée principalement par *Mycobacterium bovis*. Elle infecte les bovins mais également d'autres espèces domestiques (chèvres, moutons, porcs…) ou sauvages (sangliers, cerfs, blaireaux…). Cet agent pathogène multi-hôte est également capable d'infecter l'homme et classe la TB dans la catégorie des zoonoses. Le plan de lutte instauré en France au début des années 60 prévoit entre autre l'arrêt complet des activités de l'éleveur (commerce du bétail et du lait à l'état cru) dont l'élevage est contaminé ou suspect. Ce plan coûte à l'état entre 20 à 30 millions d'euros par an, ce qui place la TB comme une maladie à enjeux économique et social.

Dans les années 50 où la prévalence de la maladie était de 25 % dans les cheptels bovins et où la tuberculose humaine provoquée par *M. bovis* était de l'ordre de 10-30%, la pasteurisation du lait et l'assainissement des cheptels, entre autres par le biais de l'abattage des bovins infectés, ont permis de couper le cycle de transmission zoonotique. Ces mesures ont eu pour effet de diminuer le taux de prévalence de la maladie animale et ont permis à la France d'être déclarée « Officiellement Indemne de Tuberculose bovine » (OIT) par l'Union Européenne (UE) depuis 2001 (taux de prévalence de la maladie < 0.1%). Ce statut facilite grandement les échanges commerciaux.

Néanmoins, malgré le maintien du plan de lutte et des adaptations de celui-ci au contexte épidémiologique de la TB dans le temps et dans l'espace, une recrudescence de la maladie est observée en France depuis 2011, mettant en péril le statut OIT.

Dans un contexte de faible prévalence comme celui de notre pays, l'utilisation d'outils de diagnostic fiables et rapides est nécessaire à la gestion de la crise. Le manque de spécificité des tests de première intention et la lourdeur de la chaîne de diagnostic actuelle entraîne des pertes économiques importantes, souvent inutiles.

Les nouvelles méthodes moléculaires sont prometteuses et devraient permettre d'accélérer le schéma décisionnel, et ainsi de limiter les pertes liées à la gestion de cette maladie.

1. Découverte des mycobactéries d'importance en santé publique

Robert Koch décrit pour la première fois en 1882 (Kazda, 2009) l'agent responsable de la tuberculose humaine *Mycobacterium tuberculosis* en appliquant les postulats de Henle-Koch.

En 1896, Lehmann et Neumann décrivent les agents responsables de la tuberculose aviaire et bovine : *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium bovis* respectivement.
En réalité c'est en 1875 qu'est décrite par Hansen la première mycobactérie, *Mycobacterium leprae* responsable de la lèpre : après un traitement par une solution hypotonique sur des cellules infectées, il réalise une coloration mettant en évidence la bactérie.
En 1882, Ziehl et Neelsen (Kazda, 2009) introduisent la mise en évidence de *M. tuberculosis,* bacilles acido alcoolo résistants (BAAR), par coloration (portant aujourd'hui leurs noms) pour la différenciation de ces bacilles des autres bactéries. Dans un premier temps et alors que la diversité du genre *Mycobacterium* est sous-estimée, ils mettent en évidence la présence de BAAR chez des patients atteints de syphilis et concluent qu'ils en sont l'agent causal. Or, en 1896, Lehmann et Neumann identifient ce bacille comme étant *M. smegmatis*, une bactérie environnementale. L'intérêt pour ces bactéries dites « environnementales » augmente, et en 1903, Courtmont et Potet démontrent la présence de BAAR similaires au bacille de Koch sur des plantes, l'eau et le sol.
Au début du 20ème siècle, les premières mycobactéries potentiellement pathogènes sont décrites : *M. chelonae*, chez les animaux à sang froid, *M. lepraemurium* chez les souris et *M. marinum* chez les poissons. Dans les années 30, *M. avium* est mis en évidence chez des patients ayant développé des lésions tuberculeuses. Ces mycobactéries non tuberculeuses (MNT) provoquent des lésions ressemblant fortement à celles provoquées par *M. tuberculosis* et compliquent le diagnostic (Kazda, 2009).

2. Ecologie des mycobactéries

A la fin du 19ème siècle avec l'apparition des sanatoriums pour le traitement contre la tuberculose, Moeller comprend que les mycobactéries sont en lien étroit avec l'environnement. Il met en évidence la présence de BAAR à la surface des *Phleum pratense* (Fléole des près) : *Mycobacterium phlei* (Kazda, 2009). Ces recherches sont les premières études sur l'écologie des mycobactéries. Dans la seconde partie du 20ème siècle les chercheurs montrent que ces bactéries sont largement répandues dans l'environnement et placent le genre dans les bactéries dites ubiquitaires. Elles sont capables de survivre dans un large spectre de pH, de température, d'humidité, de sels ou encore en présence de métaux. Cet état de fait pousse les chercheurs à essayer de comprendre comment et pourquoi ces bactéries sont dotées de ces caractéristiques. En 2000, Kazda démontre qu'il existerait une compétition entre les mycobactéries et les autres bactéries, notamment les *Enterobacteriacea*.

3. Classification des mycobactéries

Les premières méthodes d'identification focalisées sur *M. bovis*, *M. tuberculosis* et *M. avium* utilisent l'inoculation du bacille chez des cochons, des lapins, et des poules. Les résultats montrent que *M. bovis* et *M. tuberculosis* provoquent des lésions uniquement chez le cochon et *M. avium* uniquement chez la poule. Cette méthode de diagnostic via l'expérimentation animale fut utilisée jusque dans les années 60 où sont introduits les premiers tests basés sur un diagnostic différentiel des aspects phénotypiques de la souche (dégradation de la caséine, gélatine, utilisation des citrates, production des nitrates réductases…).

D'après le manuel de Bergey (Goodfellow et al. 2012), le genre *Mycobacterium* appartient :

- au Phylum des *Actinobacteria* (bactéries à Gram positif, doté d'un génome riche en acides nucléiques G et C),
- à la Classe des *Actinobacteria*,
- à l'Ordre des *Corynebacteriales*, qui regroupe différentes familles de bactéries caractérisées par la présence d'acides mycoliques dans leur paroi et des propriétés tinctoriales particulières liées à la résistance de leur paroi à la décoloration par un mélange alcool-acide (ou BAAR)
- à la Famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comprend que le genre *Mycobacterium*, caractérisé par une enveloppe riche en acides mycoliques contenant un grand nombre d'atomes de carbone, ainsi que des quinones particulières.

En 1965, Runyon propose une classification en partageant les mycobactéries non tuberculeuses en 4 groupes, en se basant sur leur temps de croissance et leur pigmentation (tableau 1). Les mycobactéries pathogènes sont classées en un groupe à part et unique et sont toutes à croissance lente.

Tableau 1 : Classification des mycobactéries par leurs caractéristiques de croissance (Runyon 1965)

N°	Nom du groupe	Caractéristique	Exemple
I	Photochromogènes	Les colonies apparaissent en plus de 7 jours sur milieu solide et développent une pigmentation uniquement après exposition à la lumière	*M. kansasii, M. marinum, M. simiae*
II	Scotochromogènes	Les colonies apparaissent en plus de 7 jours sur milieu solide et développent une pigmentation	*M. scrofulaceum, M. gordonae*
III	Nonphotochromogènes	Les colonies apparaissent en plus de 7 jours sur milieu solide et ne développent pas une pigmentation	*Complexe avium, M. xenopi*
IV	A Croissance rapide	les colonies apparaissent en moins de 7 jours sur milieu solide	*M. fortuitum, M. chelonae*
	Mycobactéries pathogènes	Croissance lente sur milieu solide	*M. tuberculosis, M. bovis*

L'arrivée de l'étude du génome par les méthodes de biologie moléculaire dans les années 80 et notamment l'étude du gène codant pour l'ARN 16S révolutionne la taxonomie du genre et permet la description de 67 nouvelles espèces tout en confirmant l'identification des précédentes.
La complexité du genre *Mycobacterium* avec plus de 150 espèces (Kazda, 2009) décrites aujourd'hui, nécessite une classification plus factuelle. Ainsi trois grands groupes sont décrits : les pathogènes obligatoires, les pathogènes dits potentiels/facultatifs et les saprophytes en tenant compte de leurs identités génétiques et sur leurs caractéristiques physiologiques (tableau 2).

Tableau 2 : Classification des mycobactéries selon leur pathogénicité

Groupe	Caractéristiques physiologiques	Habitat	Exemple
Saprophytes (Mycobactéries non tuberculeuses)	Leur substrat est environnemental, elles ont la capacité de survivre et de se multiplier selon un large spectre de conditions de pH et de température	Terre, environnement marin, rivières, mares, aquariums, étangs, eau courante, fumier, herbe de champs, peau, muqueuses d'individus sains,	*M. gordonae, M. flavescens, M. vaccae, M. triviale, M. smegmatis, M. terrae, M. nonchromogenicum*
Pathogènes potentiels/facultatifs (Mycobactéries non tuberculeuses)		Même environnement que les saprophytes, sans perdre leur pathogénicité	*M.avium, M. chelonae, M. fortuitum, M. kansasii, M. marinum, M. scrofolaceum, M. xenopi, M. ulcerans*
Pathogènes obligatoires	Ce sont des parasites qui ne se multiplient pas dans des biotopes naturels et sont exigeantes (pH, températures)	Leur présence dans l´environnement est associée aux excrétions des animaux infectés	*M. leprae, M. paratuberculosis M. tuberculosis complex (M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. cannetii, M. microti)*

4. Caractéristiques générales des mycobactéries
    a. Morphologie

Les mycobactéries se présentent sous forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés (0,2-0,6 x 1,0-10µm), non mobiles et non sporulantes. Les colonies observées sont de couleur blanche à crème, voire jaune à orangée pour les mycobactéries productrices de pigments (Goodfellow et al. 2012). Elles possèdent une enveloppe proche de celle des bactéries à Gram positif, mais l'organisation, la richesse et la diversité des acides gras qui la composent sont uniques et caractéristiques (figure 1). La mycomembrane est constituée d'acides gras à longue chaîne contenant de 60 à 90 atomes de carbone : les acides mycoliques représentent 30 à 40% de sa masse (Brennan and Nikaido, 1995).

Cette enveloppe particulière, très riche en lipides, confère à la bactérie ses propriétés tinctoriales « Bacilles Acido-Alcoolo-Résistants » (BAAR) (qui fixent difficilement la coloration de Gram), sa grande résistance aux stress chimiques (notamment aux antibiotiques et détergents), aux stress physiques (température) ainsi que biologiques (résistance dans les macrophages de l'hôte et dans les amibes). C'est également un facteur important de virulence chez les mycobactéries pathogènes : certains composants lipidiques possèdent en effet une activité immunogène (Coulombe et al. 2009). La paroi est d'ailleurs une des cibles des antimicrobiens utilisés contre la tuberculose humaine. Les mycobactéries sont observables par la coloration de Ziehl-Neelsen qui met en évidence l'acido-alcoolo résistance des bactéries. Les bactéries apparaissent en rouge sur fond bleu.

Dans les matrices environnementales, la paroi hydrophobe des mycobactéries leur permet d'adhérer fortement aux particules en suspension dans l'eau, aux sédiments ou encore aux surfaces, favorisant ainsi la formation de biofilms et leur permettant de survivre (Primm et al., 2004). Les acides mycoliques, par leur complexité et leur variabilité structurelle, sont également utilisés comme marqueurs taxonomiques car ils permettent d'identifier avec spécificité le genre et les espèces.

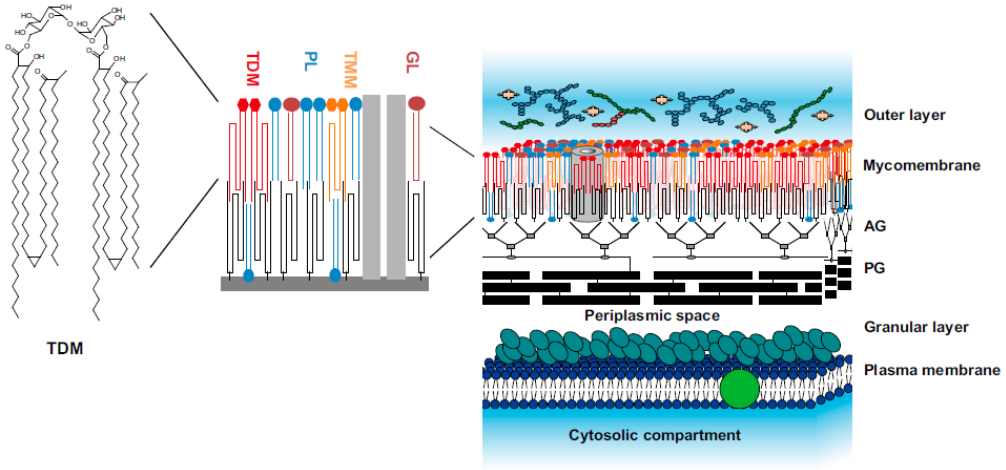


Figure 1 : Constitution de la paroi mycobactérienne

La couche externe est principalement composée de glucane et de protéines, avec seulement une petite quantité de lipides. La mycomembrane interne est formée par un arrangement parallèle de chaînes d'acides mycoliques (en noir) liées à l'arabinogalactane (AG) qui à son tour est attachée de façon covalente au peptidoglycane (PG); glycolipide (GL), trehalose monomycolates (TMM), phospholipides (PL), trehalose dimycolates (TDM) (Marrakchi et al., 2014)

b. Autres formes de résistance

De manière générale, les mycobactéries, développent des méthodes de survie leur permettant de pallier à des facteurs normalement incompatibles au développement des autres bactéries (Kazda, 2009). Elles sont capables de se multiplier dans une large gamme de pH, de température et dans des conditions oligotrophiques. Elles ont également la capacité de se mettre en état de dormance lorsque les conditions sont défavorables (oligotrophisme, manque d'oxygène…).
Pour des bactéries non sporulées, cet état physiologique réversible dépourvu de multiplication permet de conserver le matériel génétique (Kaprelyants et al., 1993). Une fois les conditions favorables restaurées, elles récupèrent leurs facultés de multiplication.
Certaines mycobactéries comme *M. smegmatis*, *M. fortuitum* ou *M. abcessus* ont la capacité de former des biofilms. Cette particularité leur confère une résistance accrue vis-à-vis des conditions hostiles de l'environnement mais également en milieu hospitalier où elles peuvent coloniser les cathéters (El Helou et al., 2013).

c. Caractéristiques culturales et phénotypiques

La plupart des mycobactéries sont aérobies strictes, mais quelques espèces tolèrent de faibles pressions d'oxygène, notamment *M. bovis* et *M. tuberculosis.* Les substrats utilisés comme sources de carbone et d'azote varient considérablement entre les espèces et peuvent servir pour leur identification. La majorité des espèces croît sur des milieux de culture classiques, mais pour certaines mycobactéries d'importance clinique, la culture est améliorée par l'utilisation de milieux à l'œuf (Löwenstein-Jensen et Coletsos) ainsi que par un enrichissement des milieux (en glycérol pour *M. tuberculosis*, en mycobactine pour *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, en hémine pour *M. haemophilum*). L'agent responsable de la lèpre *M. leprae* est cultivé sur tissus vivants (coussinets de souris, peau de tatou) et se multiplie très difficilement sur milieux synthétiques.
Les mycobactéries ont des vitesses de croissance très variables : les bactéries du MTBC sont toutes à croissance lente avec des temps de génération élevés, de 20 à 24h pour *M. tuberculosis* alors que *M. smegmatis* a un temps de génération de 2 à 3h (Smith, 2003) La température optimale de croissance des bactéries du MTBC est de 37°C alors que les MNT peuvent se multiplier dans un large éventail de températures allant de 4°C pour *M. psychrotolerans* (Trujillo et al., 2004) à plus de 45°C, voire à 52°C pour *M. thermotolerans* et *M. phlei* (Stahl and Urbance, 1990). Leurs températures optimales de croissance se situent entre 28 et 31°C.

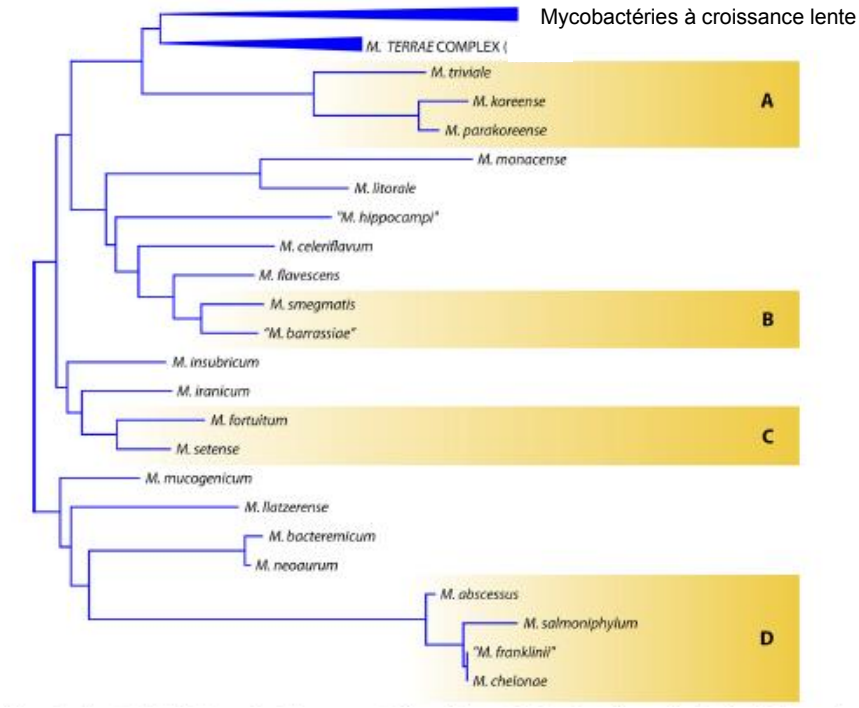


Figure 2a : Arbre phylogénétique, basé sur le gène de l'ARNr 16S, comprenant les espèces représentatives de mycobactéries à croissance rapide
(groupe A : *M. triviale*, groupe B : *M. smegmatis,* groupe C : complexe de *M. fortuitum,* groupe D : complexe de *M. chelonae*) (Tortoli, 2014)

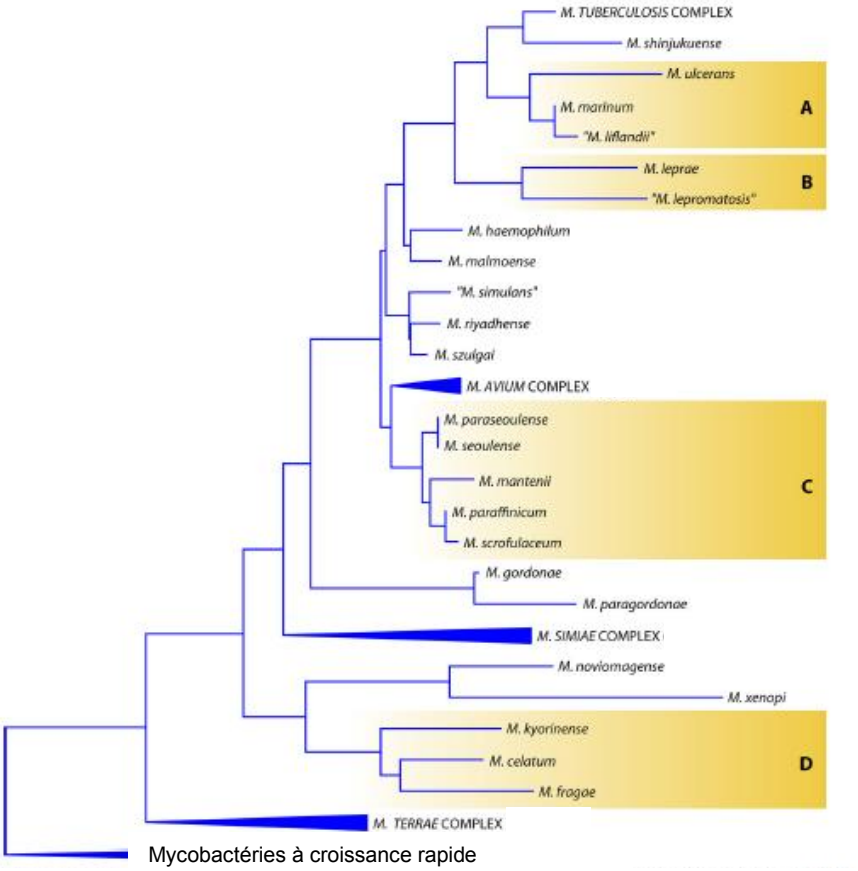


Figure 2b : Arbre phylogénétique, basé sur le gène de l'ARNr 16S, comprenant les espèces représentatives de mycobactéries à croissance lente (Tortoli, 2014)
(Groupe A : *M. marinum*, groupe B : *M. leprae*, groupe C : *M. scrofulaceum* et groupe D : *M. celatum*)

d. Phylogénie du genre *Mycobacterium*

La phylogénie basée sur le polymorphisme de l'ADN (acide désoxyribonucléique) codant pour l'ARNr (acide ribonucléique ribosomal) 16S permet de discriminer les espèces de mycobactéries et met en évidence deux grands groupes en fonction de leur vitesse de croissance. Le cladogramme présenté dans la figure 2a regroupe les mycobactéries à croissance rapide, alors que celui présenté figure 2b regroupe les mycobactéries à croissance lente.

Le genre *Mycobacterium* partage une grande similarité génétique avec les autres actinomycètes (figure 3) comme les *Rhodococcus*, les *Nocardia*, les *Gordoniae*, ou les *Corynebacterium* (Weiner et al., 2012) et partagent certains gènes, notamment le gène *hsp*65 largement décrit dans la littérature et utilisé pour la détection et l'identification des mycobactéries (McNabb et al., 2004)

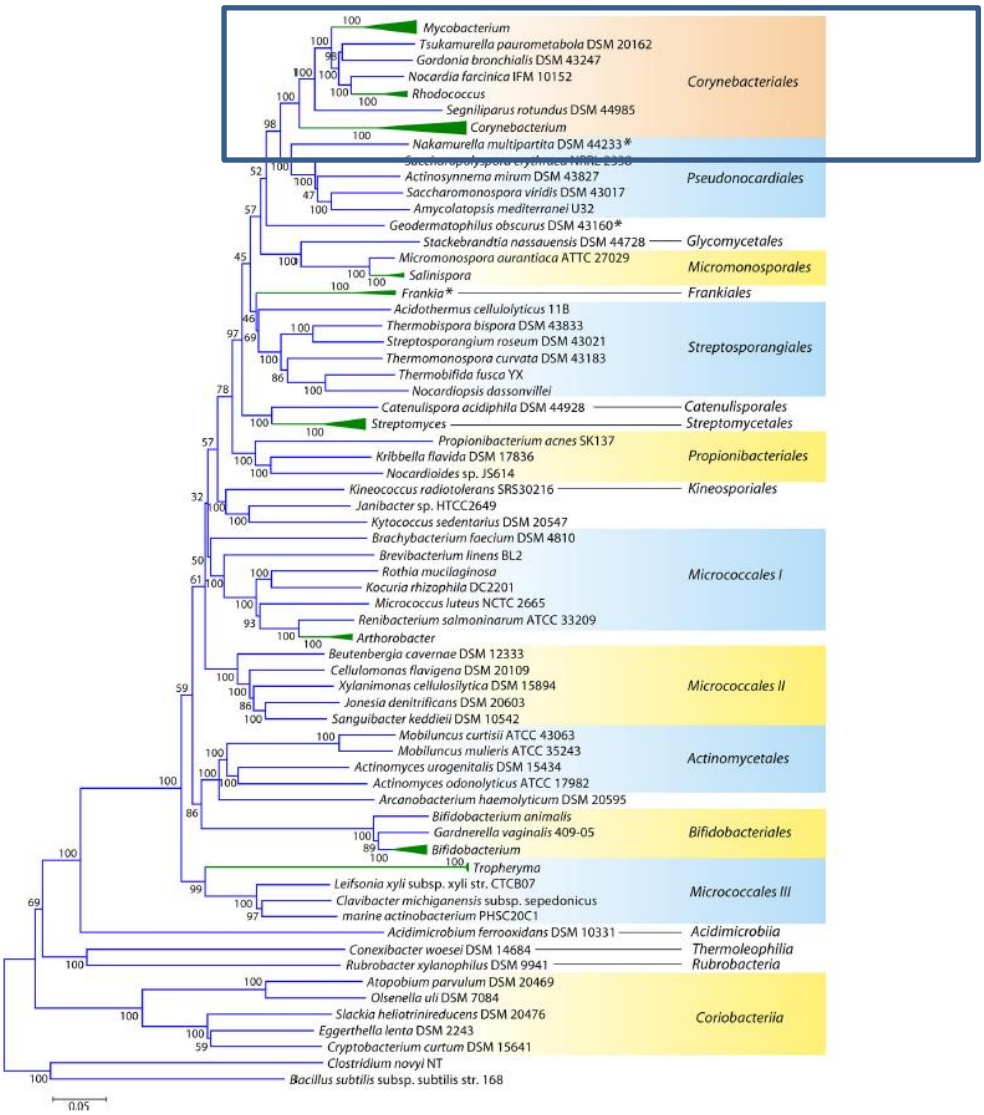


Figure 3 : Arbre phylogénétique des actinomycètes
Arbre phylogénétique pour 98 espèces d'actinobactéries dont les génomes ont été séquencés et basé sur la concaténation des séquences de 35 protéines. De nombreux genres pour lesquels des informations de séquence sont disponibles sont représentés par des triangles dans cet arbre. La taille des triangles reflète le nombre d'espèces qui ont été séquencées (Gao and Gupta, 2012)

i. Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT)

Les mycobactéries non tuberculeuses représentent la plus grande partie du genre *Mycobacterium* (plus de 150 espèces) (Tortoli et al. 2013). Comme exposé précédemment les MNT sont capables de survivre sous un large spectre de températures et de pH. Elles sont ubiquitaires et sont, à ce titre, largement répandues dans l'environnement : on les retrouve principalement dans l'eau, la terre et sur les végétaux.

Bien que la plupart des MNT soient non pathogènes, certaines sont classifiées dans la catégorie des pathogènes facultatifs et sont responsables de mycobactérioses parfois sévères chez l'homme et l'animal :

- En Afrique, l'ulcère de burulli arrive en 3ème position des mycobactérioses diagnostiquées, selon les données de prévalence, après la tuberculose et la lèpre. Cette maladie de peau est provoquée par *M. ulcerans*, dont l'habitat privilégié est l'eau, en particulier sur les végétations aquatiques (Pileggi et al. 2017).
- *M. haemophilum* est une mycobactérie environnementale à croissance lente, qui se développe préférentiellement à des températures basses. Elle est la seule mycobactérie pour laquelle il faut ajouter du fer dans le milieu de culture. Cette bactérie est responsable d'atteintes cutanées (ulcères), musculaires (pyomyosite), osseuses (ostéomyélite) et ophtalmiques. Les principales personnes touchées sont les enfants et les personnes immunodéprimées (Kazda, 2009).
- *M. abcessus* est une mycobactérie à croissance rapide, principalement retrouvée dans l'eau et se développe à des températures entre 28°C et 30°C. Découverte en 1953, elle a tout d'abord été considérée comme une sous-espèce de *M. chelonae,* avant d'être classée au rang d'espèce grâce aux données moléculaires. Elle comporte désormais 3 sous-espèces : *M. abscessus* subsp *abscessus*, *M. abscessus* subsp *boletti* et *M. abscessus* subsp *massiliense*. Ces dernières années, *M. abscessus* a été très fréquemment impliquée dans les infections invasives chez les personnes immunodéprimées et cette espèce est devenue une préoccupation en santé publique. (Tortoli, 2014)
- *M. kansasii* est une mycobactérie atypique vivant dans les eaux de surface, plutôt répandue dans les pays industrialisés. Cette bactérie est responsable d'atteintes pulmonaires sévères chez les humains immunodéprimés présentant des lésions ressemblant très fortement à celles causées par *M. tuberculosis* (Wang et al., 2015). Elle est cependant capable d'infecter les animaux à sang chaud et à sang froid, notamment dans les aquariums et est considérée comme étant un ancêtre environnemental d'un point de vue phylogénétique, du complexe *tuberculosis* (Wang et al., 2015). Elle peut être retrouvée dans les conduites d'eau potable et, potentiellement, dans les aérosols des douches chez les particuliers.

- *M. marinum* est principalement retrouvée dans l'eau de surface ou stagnante. Cette mycobactérie intracellulaire est capable de survivre dans l'environnement sous la forme de biofilms. Les amibes pourraient être des hôtes intermédiaires. Cette espèce est responsable de mycobactérioses chez les poissons (principalement d'aquarium) mais également chez l'homme : elle est à l'origine de plus de la moitié des mycobactérioses humaines. Chez l'homme, les lésions sont le plus souvent cutanées, au niveau des mains et des avant-bras. Chez le poisson l'infection se manifeste, entre autre, par un amaigrissement, un changement de comportement et devient chronique.

  Les cas de mycobactérioses par *M. marinum* sont principalement rapportés chez les professionnels et les particuliers détenant des aquariums (Keck et al. 2013).
- Le complexe *avium* (MAC) regroupe 3 sous-espèces (Rindi and Garzelli, 2014) :
  - *M. avium. avium,* est responsable de la tuberculose aviaire chez les oiseaux (sauvages et domestiques), les cochons, les bovins et autres mammifères y compris les humains immunodéprimés comme les patients atteints du VIH ou suivant un traitement médical lourd.
  - *M. avium. hominissuis* est responsable de mycobactérioses chez les oiseaux (sauvages et domestiques), les cochons, les bovins y compris les humains immunodéprimés comme les patients atteints du VIH ou en traitement médical lourd (Blázquez et al., 1997).
  - *M. avium. silvaticum* responsable de mycobactérioses chez les pigeons principalement.
  - *M. avium. paratuberculosis* responsable d'une entérite sévère chez les ruminants aussi appelée paratuberculose ou maladie de Johne ; cette bactérie est potentiellement responsable de la maladie de Crohn chez l'homme.

  Avec l'avènement des nouvelles approches de phylogénie, certaines espèces comme *M. colombiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. chimaera*, *M. marseillense* et *M. timonense* (figure 4) sont aujourd'hui rattachées au complexe *avium* (Tortoli, 2004 ; Murcia, 2006 ; Ben Salah et al., 2009).

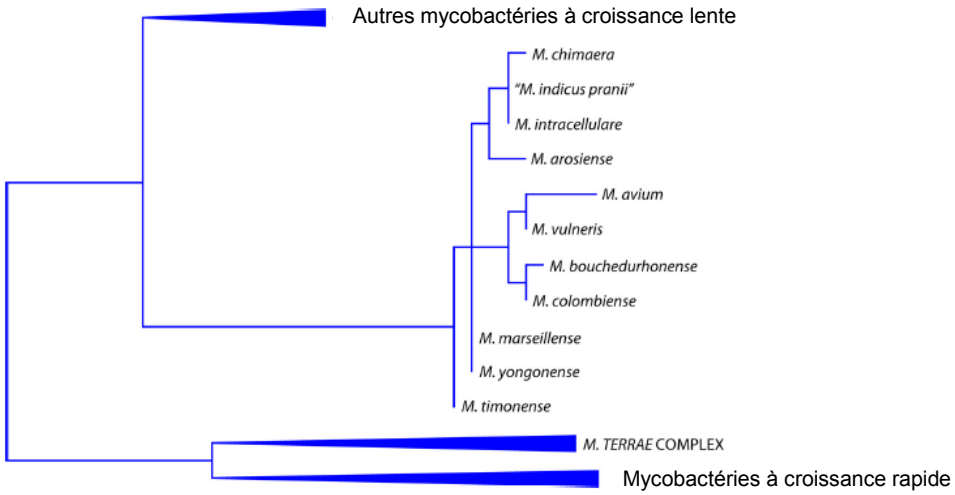


Figure 4 : Phylogénie du complexe *Mycobacterium avium*

Cette phylogénie est basée sur l'étude du gène de l'ARN 16S. Les triangles représentent plusieurs espèces d'un même groupe (Tortoli, 2014)

- Le complexe de *Mycobacterium terrae* (MTeC) est responsable de mycobactérioses aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Principalement isolé à partir de prélèvements de terre, il comptait initialement 2 espèces : *M. terrae* et *M. nonchromogenicum.* L'analyse des génomes a permis d'étoffer ce complexe qui compte désormais 11 autres espèces : *M. algericum*, *M. engbaekii*, *M. heraklionense*, *M. kumamotonense*, *M. longobardum*, *M. minnesotense*, *M. paraterrae*, *M. senuense*, *M. sinense, M. arupense, M. hiberniae* (Tortoli et al., 2013) (Figure 5). *M. nonchromogenicum* est l'une des mycobactéries environnementales les plus représentées dans l'environnement entre autres, en Irlande et en Afrique du sud (Hughes et al., 2005 ;Gcebe et al., 2013).

D'autres mycobactéries atypiques comme *M. fortuitum* et *M. xenopi* sont égalements capables d'infecter les hommes et les animaux mais à un niveau moindre.

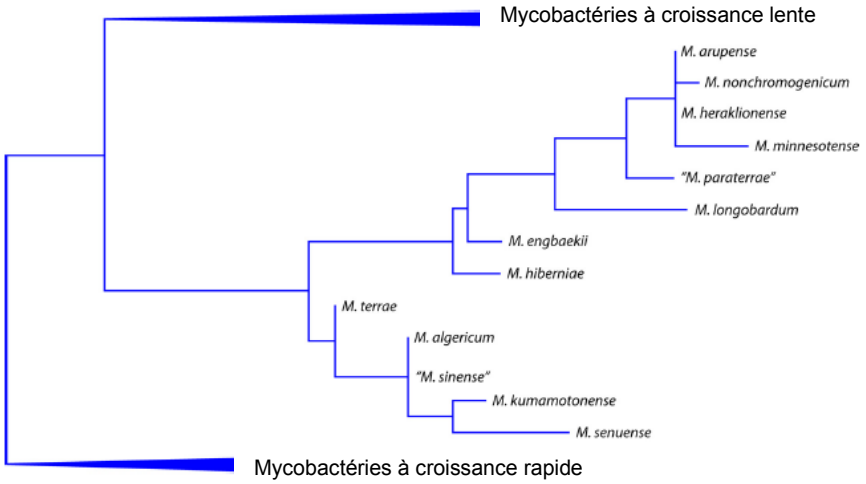


Figure 5 : Arbre phylogénétique du complexe *Mycobacterium terrae*

Cette phylogénie est basée sur l'étude du gène de l'ARN 16S. Les triangles représentent plusieurs espèces d'un groupe (Tortoli, 2014)

ii. Phylogénie des mycobactéries du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Les régions de différences (RD) sont des mutations génétiques uniques caractéristiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) et utilisées pour la discrimination du complexe. L'étude des RD et des mutations à l'échelle du nucléotide (ou SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*) dans 7 gènes (*katG, gyrA, gyrB, rpoB, mmpL6, oxyR* et ADNr 16S) ont permis de retracer la phylogénie du MTBC à partir de leur ancêtre commun : l'accumulation de délétions et de mutations permet de replacer l'évolution des espèces de mycobactéries dans le temps (Gregory G. Mahairas et al., 1996 ; Gordon et al., 1999 ; Huard et al., 2003 ; Brosch et al., 2007 ; Rodriguez-Campos et al., 2014). Le scénario de l'évolution des bactéries du MTBC est schématisé dans la figure 6. Selon les auteurs, l'ancêtre du MTBC appelé *M. protuberculosis* aurait émergé entre 15 000 et 40 000 ans en Afrique de l'Est (Gutierrez et al., 2005 ; Wirth et al., 2008).

A côté de *M. canettii*, la bactérie du MTBC génétiquement la plus proche de l'ancêtre, deux clades principaux sont décrits. Un clade de souches spécifiques de l'homme, caractérisé par la délétion TbD1, constitue les différentes lignées modernes de *M. tuberculosis* (figure 6). Un second clade caractérisé par la perte des régions RD7, RD8, RD9 et RD10 regroupe des souches endémiques en Afrique spécifiques de l'homme (*M. africanum*) et d'animaux, ainsi que des souches adaptées à différentes espèces de mammifères (*M. orygis, M. microti, M. pinnipedii, M. caprae* et *M. bovis*). Ces bactéries du MTBC ont une similarité génétique de plus de 99% au niveau de leur génome complet avec cependant des différences d'un point de vue biochimique et cultural. *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. canettii* sont toutes les 3 responsables de la tuberculose humaine.

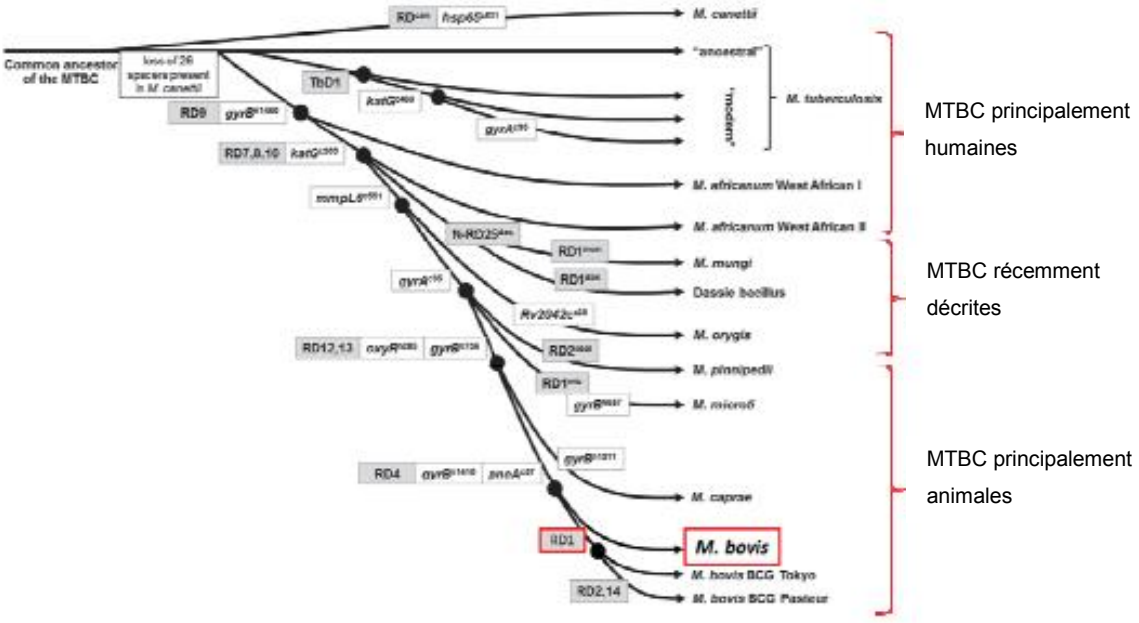


Figure 6 : Phylogénie des souches du MTBC basée sur les « *Regions of Differences* » et différents « *Single Nucleotide Polymorphism* » (Rodriguez-Campos et al. 2014)

- Les lignées humaines du MTBC

- *M. canettii* est considérée comme étant la bactérie la plus proche génétiquement de l'ancêtre commun du MTBC (Blouin et al., 2012). Elle a été décrite pour la première fois par G. Canetti en 1969 et a été rattachée au MTBC en 1997 par Van Sooligen (van Soolingen et al., 1997). Elle est caractérisée par la perte d'une région RD spécifique et est principalement retrouvée dans une zone géographique confinée à la corne de l'Afrique. La tuberculose à *M. canetti* est considérée aujourd'hui comme étant une maladie émergente. En 2013, *M. canettii* était responsable de 11% des cas de tuberculose chez l'homme en République de Djibouti, sans qu'aucun cas de transmission d'homme à homme ne soit reporté. Cette observation étaye l'hypothèse d'un réservoir environnemental (Koeck et al. 2011).
- *M. tuberculosis* a été découverte par R. Koch en 1882 et est la mycobactérie la plus connue et la plus répandue dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé en 2015 (OMS, 2016), *M. tuberculosis* aurait provoqué le décès de 1.4 million de personnes (dont 22% de personnes séropositives) atteintes de tuberculose ainsi que 10.4 millions de nouveaux cas. Ce problème de santé publique s'est considérablement aggravé avec l'apparition, un peu partout dans le monde, de souches résistantes (R), multi-résistantes (MDR) et ultrarésistantes (XDR) aux antibiotiques. De plus, cette maladie est co-endémique avec l'épidémie de VIH. Bien qu'elle se soit adaptée à l'homme, *M. tuberculosis* est capable d'infecter d'autres espèces animales, principalement domestiques (chiens, bovins,…)
- *M. africanum* a été décrite pour la première fois au Sénégal en 1968 (Castets et Savot). Elle est principalement retrouvée dans les pays d'Afrique de l'Ouest où elle est impliquée dans la moitié des cas de tuberculose humaine. *M. africanum* est subdivisée en 2 types : l'un est prévalent dans le golfe de Guinée et l'autre est prévalent en Afrique de l'Ouest Occidentale (Muller et al., 2009 ; S. Berg et al., 2011).

Trois autres membres du MTBC ont été récemment décrits sur la base d'études génomiques. Ils ont été isolés en majorité en Afrique, sont encore très méconnus et provoquent peu de cas zoonotiques :

- *M. mungi*, découverte en 2010 sur des mangoustes rayées au Botswana,

- *Dassie bacillus* est découvert en 1958 en Afrique, proche morphologiquement de *M. microti*, il est rattaché au MTBC en 2004

- *M. orygis* isolée en 1976 chez l'oryx, est longtemps considérée comme un variant de *M. bovis*. En 2012 la biologie moléculaire permet de l'intégrer au MTBC (van Ingen et al. 2012).

- Les lignées animales du MTBC

- *M. pinnipedii* est décrite pour la première fois en 1991 et intégrée au MTBC en 2003. Elle infecte principalement les pinnipèdes sauvages ou en captivité. Des infections humaines ont été rapportées de façon sporadique notamment chez les soigneurs des parcs zoologiques aux Pays-Bas. (Kiers et al. 2008 ; de Amorim et al. 2014). Des traces d'infection à *M. pinnipedii* ont été identifiées sur des dépouilles de Péruviens momifiés depuis plus de 1000 ans et suggère un rôle éventuel des pinnipèdes dans la transmission de la tuberculose humaine en Amérique du Sud (Bos et al., 2014).
- *M. caprae* est, avec *M. bovis,* responsable de la tuberculose bovine. Elle a initialement été identifiée en 1999 suite à l'isolement d'une souche caprine comme *M. tuberculosis subsp caprae*. C'est en 2003 qu'elle a été relevée au rang d'espèce. *M. caprae* est capable d'induire des lésions macroscopiques typiques de la tuberculose bovine et est caractérisée par certaines délétions typiques (voir ci-après). Elle est retrouvée principalement en Europe, (Espagne, Italie, France, Allemagne, Suisse) (Aranaz et al., 1999 ; Prodinger et al., 2005 ; Amato et al., 2017) semble s'étendre d'un point de vue géographique et de variété d'hôtes (bovins, caprin, ovins, cerfs, sangliers…). *M. caprae* est également capable d'infecter l'homme et à ce titre devient une préoccupation en santé publique puisqu'elle est responsable de 0.3 % des cas de tuberculose humaine en Espagne.
- *M. microti* a été découverte en 1937 au Royaume Uni. Elle est responsable de la tuberculose des petits rongeurs, mais des infections avérées ont également été décrites chez différentes espèces animales (chats, sangliers, blaireaux, bovins, porcs) ainsi que chez l'homme (Niemann et al., 2000). Dans certains cas elle provoque des lésions typiques de tuberculose et interfère dans le diagnostic actuel de la tuberculose bovine (Jahans et al. 2004). En effet l'infection à *M. microti* n'est pas considérée comme une maladie animale de catégorie 1 ni à déclaration obligatoire. Largement répandue dans la faune sauvage et vectorisée par les rongeurs, il est nécessaire de différencier *M. bovis* et *M. microti* lors du diagnostic. *M. microti* est difficilement cultivable, ce qui implique que sa prévalence et sa diversité génétique sont largement sous-estimées (Smith et al. 2009).
- *M. bovis* est l'agent responsable de la tuberculose bovine, maladie présente sur tous les continents. Les bovins constituent le réservoir naturel du bacille, mais un grand nombre d'espèces, incluant l'homme, peuvent être infectées dans la faune sauvage et domestique. L'analyse des caractéristiques génomiques de *M. bovis,* initiée en 2003, a permis d'identifier à ce jour 4 groupes clonaux majoritaires dans le monde en se basant sur la présence de délétions caractéristiques et/ou sur des SNP ainsi que sur le spoligotypage. Le Complexe African 1 est retrouvé dans plusieurs pays africains (Mali, Cameroun, Nigéria, Tchad) (Müller et al. 2009). Le Complexe African 2 est essentiellement retrouvé chez les bovidés d'Afrique de l'Est (Berg et al. 2011). Le Complexe European 1 est retrouvé en Europe, où il est dominant au Royaume-Uni, et beaucoup plus rare en Espagne, au

Portugal et en France (Smith et al. 2011). Enfin, le Complexe European 2 est majoritaire au Portugal et en Espagne et assez fréquent en France et en Italie (Rodriguez-Campos et al. 2012). En France, plusieurs complexes clonaux coexistent, certains complexes autochtones évoluant depuis longtemps sur le territoire, alors que d'autres ont été importés à la faveur des échanges commerciaux de bovins (Hauer et al., 2015). La délétion de la région de différence 1 (RD1) (figure 6) conduit à l'obtention de la souche vaccinale : le bacille de Calmette et Guérin (BCG). La souche BCG est tronquée dans la région RD1 alors que la souche sauvage ou non atténuée possède la RD1 entière (G. G. Mahairas et al. 1996). Cette caractéristique permet de discriminer la souche vaccinale de la souche virulente, notamment dans le cadre d'études portant sur la vaccination des animaux.

e. Identification des mycobactéries

i. Caractérisation phénotypique

La grande diversité du genre *Mycobacterium* rend difficile la différenciation des mycobactéries. L'étude différentielle des caractéristiques biochimiques, culturales et pariétales constituaient les références en matière d'identification. Les caractères biochimiques sont étudiés selon des techniques de microbiologie classique avec la mise en culture, les tests biochimiques et les colorations. Les principaux tests biochimiques utilisés pour l'identification des mycobactéries à croissance lente sont listées dans le tableau 3 (liste non exhaustive).

Tableau 3 : Principales caractéristiques aux tests biochimiques pour la discrimination des mycobactéries à croissance lente (adapté de Tortoli, 2003)

	Arylsulfatase (3jours)	**Catalase semi-quantitative (mm)**	**Catalase 68°C**	**Nitrate réductase**	**Hydrolyse du tween 80**	**Uréase**	**Pigment**
M. bohemicum	-	<45	+	-	-	+/-	+
M. botniense	-	<45	-	-	-	-	+
M. branderi	+	<45	+	-	-	-	-
M. canettii	ND	ND	-	+	-	ND	-
M. celatum	+	<45	+	-	-	-	+
M. conspicuum	+	<45	+	-	+	-	+
M. cookii	+	ND	ND	-	-	-	+
M. doricum	-	<45	+	+	-	+	+
M. genevasense	-	>45	+	-	-	+	-
M. heckeshornense	-	<45	+	-	-	-	+
M. heidelbergense	-	ND	+	-	+	+	-
M. hiberniae	-	>45	+	+	v	-	+
M. interjectum	-	<45	+	-	-	+	+
M. intermedium	+	>45	+	-	+	+	+
M. kubicae	-	>45	ND	+	-	-	+
M. lacus	+/-	<45	ND	+	+/-	+	-

Comme exposé précédemment, les parois des mycobactéries sont composées d'acides mycoliques dont le nombre d'atomes de carbone (60 à 90) et les groupes fonctionnels varient d'une espèce à l'autre. Ces différences sont utilisées en chromatographie pour la caractérisation et l'identification des espèces (Tortoli, 2003).

Plusieurs méthodes peuvent être employées pour la caractérisation des acides mycoliques : la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase liquide haute performance, la chromatographie en phase gazeuse et plus récemment la spectrométrie de masse avec la technique MALDI-TOF. Des profils de référence ont été établis et permettent l'identification d'une souche par la caractérisation de sa paroi (tableau 4).

Ces méthodes de caractérisation phénotypiques présentent des limites de spécificité, au regard de l'étendue du genre et de sa similarité. Le tableau 4 est une liste non exhaustive de la diversité des types d'acides mycoliques et des mycobactéries les possédant. Les auteurs mettent en évidence le fait que différentes mycobactéries peuvent présenter un même profil. Pour exemple *M. abcessus* et *M. chelonae* sont toutes les deux dotées des acides de type I et II (tableau 4), ce qui les rend non différentiables par cette méthode.

Tableau 4 : Distribution des différents types d'acides mycoliques de mycobactéries

	Type d'acides mycoliques							
Espèces	I	II	III	IV	V	VI	VII	**Espèce avec le même profil**
M. abscessus	+	+	-	-	-	-	-	*M. chelonae*
M. alvei	+	-	-	-	-	-	+	-
M. bohemicum	+	-	+	+	-	+	-	*M. komossense*
M. branderi	+	-	-	+	-	+	-	profile commun
M. brumae	+	-	-	-	-	-	-	*M. fallax, M. triviale*
M. canettii	+	-	+	+	-	-	-	profil commun
M. celatum	+	-	-	+	-	+	-	profil commun
M. chlorophenolicum	+	-	-	+	-	+	-	profil commun
M. confluentis	+	-	-	+	-	-	-	*M. bovis* BCG
M. conspicuum	+	-	-	+	-	+	-	profil commun
M. cookii	+	+	-	-	-	+	-	-
M. doricum	+	-	+	-	-	+	-	-
M. elephantis	+	-	-	+	-	+	-	profil commun
M. frederiksbergense	+	-	-	+	-	+	-	profil commun
M. genevasense	+	+	-	+	-	-	-	*M. heidelbergense, M. intermedium, M. lentiflavum, M. malmoense, M. simiae*

I : L,α-mycolate, II : α'mycolate, III : methoxy mycolate, IV: keto-mycolate, V: epoxy-mycolate, VI : wax esters, VII : ω1-methoxy-mycolate. (+) : présence; (-) : absence (adapté de Tortoli, 2003)

Ces deux méthodes d'identification basées sur l'étude des caractères phénotypiques, ne permettent pas une identification précise de l'espèce, ceci étant principalement dû à la forte similarité phénotypique du genre. Ce type de diagnostic classique (galeries traditionnelles, tests biochimiques, chromatographies) est d'autant plus lourd sur des souches à croissance lente comme le sont les espèces mycobactériennes à pouvoir pathogène.

ii. Caractérisation moléculaire

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, la caractérisation génétique est devenue un élément clé dans la discrimination du genre. Ainsi, l'étude du polymorphisme de gènes de ménage tels que les gènes *secA1*, *16S-23S*, *hsp65*, *rpoB*, *gyrB*, (tableau 5) a remplacé les méthodes de caractérisation phénotypiques. Ces gènes codent pour des protéines fonctionnelles communes à tous les types cellulaires. Les nouvelles approches phylogéniques, basées sur les gènes 16S*rRNA* ou *rpoB*, ont permis notamment de classifier différemment les membres du MAC avec la mise en évidence de nouvelles espèces (décrit précédemment). Cependant, l'utilisation de ces gènes, présents chez toutes les mycobactéries n'est pas toujours utilisable pour la discrimination au sein du MTBC.

Tableau 5 : Utilisation de gènes de ménage pour l'identification de mycobactéries

Référence	Cible	méthode utilisée
(Goh et al., 2006) (Armas et al. 2016)	*gyrB*	analyse de séquence ou RFLP
(Zelazny et al., 2005) (Davis et al., 2009)	*SecA1*	analyse de séquence, PCR spécifique
(Higgins et al., 2011) (Dastranj et al., 2017) (Liu et al., 2016)	*rpoB*	analyse de séquence, RFLP, ou PCR spécifique
(Bavykin et al., 2004) (Dastranj et al., 2017)	*16S-23S rRNA*	analyse de séquence
(McNabb et al., 2004) (Liu et al., 2016)	*hsp65*	analyse de séquence, RFLP, PCR spécifique

Certaines cibles moléculaires sont identifiées et décrites comme étant spécifiques de certaines espèces comme les éléments d'insertion (IS). Présentes chez de nombreuses espèces bactériennes, parfois en plusieurs exemplaires, ces séquences permettent l'intégration d'ADN étranger dans le génome. Chez les mycobactéries, les éléments d'insertion IS*6110* et IS*1081* sont utilisés pour la caractérisation du complexe MTBC.

Depuis les années 90, Les méthodes de type RFLP sur IS*6110* pour une différenciation intra complexe (Rezaee et al. 2016) ont permis les premières caractérisations du MTBC. Au sein du MTBC, les IS sont très souvent présents en multicopie dans le génome, leur nombre peut varier au sein d'une même espèce. Cette caractéristique permet de poser les bases d'un suivi épidémiologique et d'augmenter la sensibilité des méthodes de détection. Pour les mycobactéries environnementales, ces éléments sont aussi utilisés pour l'identification, avec la caractérisation du complexe *avium* à l'aide des éléments IS*1245*, IS*900*, IS*901* et IS*902* (Keller et al., 2002 *;* Rindi and Garzelli, 2014).

Les RD sont également utilisées pour la différenciation du MTBC (comme présenté plus haut) ; Quatre d'entre elles sont essentiellement analysées (tableau 6) (Warren et al. 2006). Les RD sont des évènements uniques et irréversibles. Des études de génomique comparative entre les différents membres du MTBC ont permis de mettre en évidence des phénomènes de réarrangements de séquences. Il existe ainsi 14 RD entre la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv et la souche vaccinale BCG Pasteur. Ces réarrangements permettent de suivre phylogénétiquement les souches du MTBC.

Tableau 6 : Exemple de RD utilisées pour la discrimination du MTBC (Warren et al. 2006)

Espèce	RD1	RD1 ^{BCG}	RD4	RD9	RD12
M. tuberculosis	+	-	+	+	+
M. africanum	+	-	+	+	+
M. microti	+	-	+	-	+
M. pinnipedii	+	-	+	-	+
M. caprae	+	-	+	-	-
M. bovis	+	-	-	-	-
M. bovis ^{BCG}	-	+	-	-	-

II. Physiopathologie et épidémiologie de la tuberculose bovine

1. La tuberculose bovine : signes cliniques

M. bovis est capable d'infecter tous les organes et tissus d'un hôte infecté, en fonction de la voie d'entrée du micro-organisme. On observe 3 formes principales :

- La forme respiratoire : la bactérie se loge dans les alvéoles suite à l'exposition des voies aériennes à des aérosols contaminés. Dans 95% des cas, les bovins tuberculeux sont atteints par cette forme via les poumons, les nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens et bronchiques (figure 7a).
- La forme digestive : c'est la deuxième voie d'entrée du bacille dans l'hôte, elle est due à l'ingestion de produits contaminés (lait, viande,…). Cette forme peut atteindre tous les organes, bien qu'elle atteigne principalement les nœuds lymphatiques mésentériques, le foie et la rate chez les bovins (figure 7b).
- La forme cutanée : elle survient par le contact d'une peau lésée ou d'une muqueuse contaminée. Cette pénétration transcutanée nécessite une dose infectieuse très élevée et l'infection sera visible au point d'entrée (Sigurdson B, 1945 ; O'Reilly and Daborn, 1995).

La tuberculose bovine est une maladie à progression lente, généralement chronique, avec alternance de phases aigües et de phases de latence, mais généralement silencieuse. Les symptômes cliniques sont variés et non spécifiques : les animaux atteints manifestent une faiblesse, un état anorexique et un amaigrissement anormal. L'animal peut également présenter une toux sèche avec des diarrhées et de la fièvre. Les lésions internes provoquées par *M. bovis* peuvent être macroscopiques (30% des cas) ou microscopiques (70% des cas). Ces dernières sont souvent invisibles lors de l'inspection des carcasses.

L'animal excrète également la bactérie lorsqu'il est à un stade avancé, via les fèces, les urines ou les muqueuses nasales.

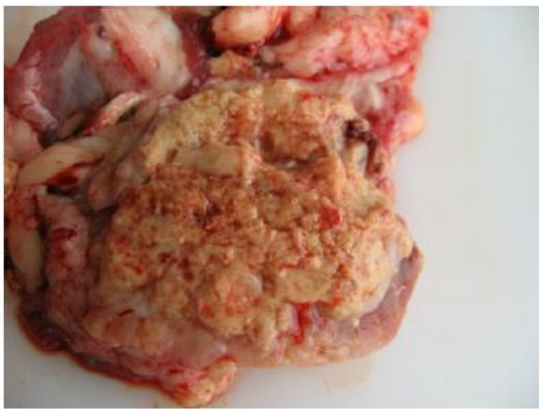


Figure 7a : Lésion caséeuse sur un ganglion rétro-pharyngien (Source : Fabrice Chevalier, DDecPP 21)



Figure 7b : Lésion caséeuse sur un ganglion médiastinal (Source : Fabrice Chevalier, DDecPP 21)

2. Réservoirs de la tuberculose bovine

a. *M. bovis*, un agent pathogène multi-hôte

Un agent pathogène multi-hôte est un organisme capable d'infecter différents hôtes. C'est le cas de 62 % des pathogènes zoonotiques et 77% des pathogènes infectant les animaux domestiques (Cleaveland et al. 2001). Il s'agit d'un agent pathogène dit « généraliste », contrairement aux agents pathogènes dit « spécialistes » qui ne sont capables d'infecter qu'une seule espèce (ou des espèces très proches) (Woolhouse et al., 2001). Cette capacité à s'adapter à un large spectre d'hôtes représente un facteur de risque d'émergence de la maladie, chez les humains et les animaux (domestiques et sauvages). Cette faculté d'adaptation est vraisemblablement liée à la voie de transmission : un agent transmissible uniquement de façon directe favorise les transmissions intra-spécifiques alors que les transmissions par voies indirectes ou vectorielles favorisent les transmissions inter-spécifiques et élargissant ainsi le spectre d'hôtes infectés (Fenton et al. 2005).

b. Hôtes et statut épidémiologique

Le statut épidémiologique d'un hôte est conditionné par sa capacité à maintenir et transmettre la maladie. Ainsi, différentes terminologies sont déclinées suivant le rôle épidémiologique qui lui est donné. (Haydon et al. 2002).

- Les « hôtes réservoirs » : l'infection persiste de façon autonome par transmission intra-spécifique et ils représentent une source d'infection pour les autres espèces (Ashford, 2003).
- Les « hôtes de liaison » : sont incapables de maintenir de façon pérenne l'infection seule, mais sont capables de la transmettre (Corner, 2006).

Ces deux catégories peuvent devenir, le cas échéant et dans une zone donnée, des hôtes vecteurs spatiaux ou temporels permettant à l'infection de s'étendre ou de durer dans le temps.
Il existe également des hôtes dit « cul de sac épidémiologique », ne jouant aucun rôle dans la maintenance et la transmission de la maladie. Ils ne rentrent pas dans la communauté d'hôtes réservoir (Nugent, 2011).

3. Tuberculose bovine dans la faune sauvage

Comme indiqué précédemment, le bovin est le vrai réservoir de la tuberculose bovine. Cependant la faune sauvage aux alentours des cheptels infectés peut également être infectée par les mêmes souches et peut en retour être la cause d'infections de bovins par leur proximité.
Les risques de transmission de l'infection inter et/ou intra-spécifique et/ou retour aux bovins sont multifactoriels (tableau 7). Il est extrêmement difficile de hiérarchiser l'impact de ces facteurs, chaque situation étant unique. L'effet de chaque facteur peut être potentialisé ou au contraire être annulé par d'autres facteurs antagonistes. L'évaluation des risques est d'autant plus complexe que les facteurs peuvent évoluer dans le temps et l'espace.

Cependant, la transmissibilité de *M. bovis* repose sur la capacité de l'hôte à s'infecter et à excréter, ce qui dépend de la réceptivité et de la sensibilité de l'hôte vis-à-vis de l'agent pathogène en plus des comportements alimentaires et sociaux. La transmissibilité de *M. bovis* dépend également du niveau et du type d'interactions entre ces hôtes. Pour que l'infection soit pérennisée, ils doivent interagir longtemps et fréquemment, avec un type de contact permettant à l'hôte d'être en présence d'une dose suffisante de bactéries. Selon les cas, il s'agira de contacts intra et/ou inter spécifiques directs ou indirects. Certaines pratiques cynégétiques, les structures paysagères et les pratiques d'élevage influent également sur ces interactions.

Tableau 7 : Facteurs impliqués dans la circulation de *M. bovis* dans la faune sauvage

Facteurs	Impact	Références
Comportements sociaux olfaction, toilettes mutuelles, soins parentaux, grégarisme…	Augmente le contact entre animaux et/ou sécrétions infectés (urine, fèces)	(Conner et al. 2008) (Woodroffe et al. 2009)
Comportements spatiaux regroupements, migration, groupes sociaux, densité des populations, …		(Smith, 2001) (Blanchong et al. 2007) (Gortazar et al. 2011)
Comportements territoriaux marquage, agressivité		(Payne, 2014)
Régime et comportement alimentaire brouteurs, nécrophages,	Consommation de viscères infectés, de lombrics (aérosolisation de particules)	(Michel et al., 2006) (Nugent, 2011)
Réceptivité	Chaque espèce est plus ou moins réceptive à la TB et elle dépend entre autre de la voie d'entrée et la dose infectante	(Lugton et al., 1998) (Zanella et al., 2008)
Facteurs externes Climat, structure géographique, ressources en eau	Les périodes de sécheresse et la concentration dans des points d'eau, les structures paysagères d'enfermement, les regroupements, peuvent favoriser les contacts entre animaux	(Palmer et al., 2004) (Vicente et al. 2007) (Vourc'h et al. 2008) (ANSES, 2011)
Pratiques cynégétique et abandon de carcasse	L'affouragement favorise les attroupements. On note également que l'abandon de carcasse après la chasse augmente les risques pour les espèces nécrophages.	(Palmer et al., 2004) (Vicente et al., 2007)

4. La tuberculose bovine en élevage
    a. Les voies de contamination

A l'image de la circulation de la tuberculose bovine dans la faune sauvage, la dissémination de la maladie en élevage est multifactorielle. Chez les bovins, la principale voie d'excrétion du bacille se fait via le mucus nasal et trachéal, ce qui favorise la dissémination de la maladie par la constitution d'aérosols et via l'olfaction. Parfois, il a été observé l'excrétion du bacille dans les fèces d'animaux infectés. La quantité de bacilles excrétés est proportionnelle à la dose infectante et au stade de la maladie.

De manière générale, la découverte de la contamination d'un troupeau résulte de 3 raisons principales:

- La contamination par **introduction** d'un animal
- La contamination par **voisinage**
- La **résurgence**

L'importance respective de chacun des facteurs causaux dépend des conditions épidémiologiques locales.

- **L'introduction d'un animal infecté,** suite à des mouvements d'animaux au sein des élevages, représente un risque pour la dissémination de la pathologie. Lors d'échanges commerciaux, les bovins issus de cheptels infectés et susceptibles de l'être sont en contact avec des animaux sains, notamment si les trajets ne sont pas directs (Humblet et al., 2009). En effet, durant leur trajet, ils peuvent être acheminés vers des centres de rassemblement avant d'arriver à leur cheptel d'accueil. Cette pratique multiplie les risques de propagation de la bactérie via les animaux en contact avec le bovin infecté qui pourront à leur tour contaminer leurs cheptels respectifs s'ils se contaminent. Les manifestations agricoles sont aussi un lieu à risque où les animaux de diverses origines se regroupent et ces lieux constituent des évènements propices à la contamination du bétail qui retourne dans son cheptel.
- **Le voisinage,** dû à la proximité des cheptels influe sur la propagation de la maladie. En effet, certains élevages très proches les uns des autres peuvent le cas échéant, partager certaines ressources comme les pâtures, les points d'eau, les pierres à sel (Kaneene et al., 2017) et ainsi augmenter les interactions entre bovins. Les contacts directs sont ainsi favorisés, augmentant les risques de contamination. La faune sauvage présente également une source lors d'infection retour. Il est important de souligner, que les pratiques de « bon voisinage » entre éleveurs constituent une voie de contamination. En effet, le prêt de matériel, de nourriture ou l'accueil temporaire de bêtes sont des pratiques à risque (ANSES, 2011).

- **La résurgence,** est une infection ancienne ou la réapparition de la maladie dans un cheptel anciennement atteint puis assaini sans réintroduction du bacille. Elle est liée à sa persistance à bas bruit chez des animaux infectés mais non détectés. En effet, dans le cas d'abattage partiel, certains animaux échappent aux tests de première intention et deviennent une source de contamination. L'existence d'une source secondaire de contamination ne peut être exclue, et ce malgré les protocoles de désinfection (fumier, ensilage, pâtures).

b. Facteurs de risques liés à l'élevage

- **Le type d'élevage** joue un rôle essentiel dans la prévalence de la tuberculose bovine. Jusqu'en 2000 en France, des études ont montré que les cheptels laitiers étaient plus susceptibles d'être infectés que les cheptels allaitants (Bekara et al., 2016). En effet, les cheptels laitiers ont un taux de renouvellement supérieur et donc un risque à l'introduction supérieur. Les cheptels allaitants ont une durée de vie supérieure à celle des cheptels laitiers puisque un animal est réformé vers l'âge de 12 ans dans le 1er cas et vers 5-6 ans dans le second. Cette longévité augmente le risque d'une transmission par voisinage et/ou par résurgence puisque l'animal est exposé plus longtemps aux infections éventuelles et participe plus longtemps à la contamination de son environnement par l'excrétion du bacille. Les 2 types d'élevages présentent des risques à différents niveaux pour la propagation de la maladie (Bekara et al., 2016).
- **La taille du cheptel et sa densité** augmentent le risque d'interaction entre animaux. Plus les cheptels sont grands, plus les parcelles sont nombreuses, ce qui augmente le risque de contaminations par voisinage. Plus la taille des cheptels est élevée et plus l'intervention humaine (vétérinaires, éleveurs) devient difficile, ce qui a pour effet de diminuer la fréquence des contrôles. Une étude démontre l'impact de la densité des cheptels sur la maladie en observant une diminution de celle-ci au fil des années (bien que la taille des cheptels augmente) en parallèle de la diminution de la prévalence de la maladie (Bekara, 2014).
- **La conduite d'élevage,** comme le confinement, la stabulation prolongée, la non-aération des locaux, les mauvaises conditions d'hygiène et d'alimentation (stockage de la nourriture) sont tous des facteurs favorisant l'apparition et la propagation de l'infection. Le séjour prolongé des bovins au pré est susceptible d'augmenter les contacts directs et indirects avec la faune sauvage infectée. L'élevage allaitant est caractérisé par une longue période de pâturage entre avril et octobre puis une hivernation en bâtiment au moment des vêlages. Certaines races, comme les Salers, passent toute l'année en pâturage. Le surpâturage est également un facteur de risque pour les bovins augmentant les contacts directs intra-espèces, et oblige parfois les bovins à brouter les latrines de blaireaux et à ingérer des quantités de sol plus importantes.

Les zones d'abreuvement, de nourrissage et les pierres de sel constituent des postes de rassemblement et sont très attractifs pour la faune sauvage. Par ailleurs, le fumier répandu dans les pâtures peut également constituer un risque d'infection par voie orale en cas de dose élevée. En effet, les bacilles sont capables de survivre dans l'environnement une fois les fèces étendues dans les prairies, bien que l'excrétion du bacille par cette voie chez les bovins soit peu fréquente et irrégulière (Palisson, 2016).

5. Circulation de *M. bovis* dans l'environnement
    a. Sources de contamination

Les animaux infectés sont capables d'excréter *M. bovis* via différentes voies et constituent une source de contamination potentielle pour l'environnement. Les voies d'excrétion et le niveau d'excrétion dépendent de la localisation et de la sévérité des lésions. Les schémas lésionnels indiquent que *M. bovis* est susceptible d'être excrété par voie orale ou nasale lors d'infections pulmonaires et/ou des nœuds lymphatiques céphaliques, par voie digestive via les matières fécales et par voie urinaire lors d'infections généralisées (Phillips et al., 2003).
Les effluents d'élevage ou urbains sont potentiellement des sources de contamination. Bien que peu d'études le démontrent, l'épandage du fumier, des eaux usées et des lisiers sur les terres agricoles peuvent constituer un risque potentiel pour l'environnement, que ce soit le sol ou les eaux profondes et/ou de surface. Les découpes d'animaux infectés dans les abattoirs présentent également un risque lors de l'élimination des effluents. En France, les effluent d'abattoirs sont traités et contrôlés ; cette source de contamination est donc peu probable. Cependant, cette source de contamination serait à considérer dans les pays ne disposant pas de mesures et de structures permettant le traitement des déchets. D'autre part, des bacilles de *M. tuberculosis* (agent de la tuberculose humaine) ont été retrouvés dans les eaux usées de certaines villes, comme Téhéran (Velayati et al., 2015).

    b. Survie de *M. bovis* dans l'environnement

La température, l'exposition aux UV, l'humidité et le pH sont des facteurs influençant la survie de *M. bovis* et ce quelle que soit la matrice (Barbier et al., 2017). À ce titre, le rythme des saisons impacte le bacille, puisqu'il a été montré que *M. bovis* survivait moins longtemps pendant les saisons arides que pendant les saisons plus fraîches et humides comme l'automne et l'hiver (tableau 8). Les études montrent que *M. bovis* peut survivre de quelques jours à quelques mois (voire 2 ans dans certains cas) dans les fèces, les effluents, le sol, les aliments et divers excrétas d'animaux. La variabilité des matrices testées explique vraisemblablement un tel écart de survie (tableau 8)

Tableau 8 : Survie de *M. bovis* dans l'environnement (adapté de Barbier, 2016)

Matrices inoculées	Concentration de l'inoculum	Conditions	Méthodes de détection de *M. bovis*	Résultats de survie (virulence) de *M. bovis*
Fèces de bovin	Inconnue	Expérimentales (température fraîche, obscurité)	Injection souscutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	12 mois dans fèces naturellement infectées
	5.10^4 à 5.10^7 UFC			2 ans dans fèces artificiellement infectées
Lisier de bovin	5000 UFC/cm^3	Expérimentales (température fraîche, obscurité)	Injection souscutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	Survie 4 mois avec diminution de la virulence du bacille au cours du temps
Fèces de bovin	5.10^4 à 5.10^7 UFC	Environnementales (pâture)	Injection sous-cutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	5 mois en hiver 4 mois en automne 2 mois au printemps, été 4 mois si protection UV en été 6 mois si protection insectes-vers en automne
Sol Sol + Fèces de bovin Bouse	Inconnue	Environnementales (pâture)	Injection sous-cutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	178 j dans toutes les matrices
Herbe	$1,2.10^5$ / 0,1 m^2	Environnementales	Injection souscutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	14 jours
	$1,2.10^6$ / 0,1 m^2			28 jours
	120.10^6 / 0,1 m^2			49 jours
Effluents animaux Boues d'épuration		Environnementales		Abattage 90% en 11 jours pour sols arrosés avec effluents, 8 jours avec boues Isolement après 4 à 6 jours sur des radis et jusqu'à 35 jours sur des laitues
Excrétas de blaireaux conservés dans un terrier		Environnementales	Culture	Urine : 3 jours en été, 28 jours en hiver Mucus bronchique : 7 et 70 jours Fèces naturellement infectés : 14 et 28 jours
Betterave, pommes, carottes, pommes de terre, maïs, foin	$1,1 \times 10^6$ UFC/10g	Expérimentales (-20, 8 et 23°C)	Culture	112 jours à -20°C pour tous les substrats 112 jours à 8°C pour pommes, maïs, foin et pdeterre 112 jours à 23°C pour pommes, maïs et pdeterre
Sol, foin, maïs, eau	$5,0 \times 10^4$ UFC/échantillon	Environnementales	Culture	88 jours dans le sol en hiver/printemps 58 jours dans l'eau, 43 jours dans le foin et 37 jours dans le maïs en automne/hiver

c. La faune du sol

Une étude menée en Côte d'Or a mis en évidence le rôle potentiel des lombrics dans la dissémination de la maladie. Ce vers appartenant à l'ordre des *Haplotaxida*, très largement répandu dans les sols des pâtures et consommé par certains mammifères comme les sangliers et les blaireaux, est capable de transporter dans son tube digestif des bactéries pendant environ 4 jours. La caractéristique principale de cet animal est de mélanger la terre via les turricules qu'il forme à la surface ou sous la terre qui permettent potentiellement d'enfouir *M. bovis* à quelques centimètres sous la surface et augmentent vraisemblablement sa capacité de survie (Elodie Barbier et al., 2016).

Les amibes sont des eucaryotes unicellulaires, vivant aux interfaces eau-sol, eau-plante et eau-air (Sanchez-Hidalgo et al., 2017) où elles « broutent » les bactéries, les champignons et les algues dont elles régulent les communautés. Les amibes pourraient même constituer un véritable réservoir pour *M. xenopi* (Thomas et al., 2006 *;* Drancourt et al., 2007).

La survie de *M. bovis* au sein des amibes a récemment été démontrée (Sanchez-Hidalgo et al., 2017). La bactérie se loge dans l'amibe et est capable d'infecter de nouveau lorsqu'elle est inoculée : la pathogénicité de *M. bovis* ne semble donc pas être altérée. Il reste à étudier la contamination primaire de l'amibe, mais elle pourrait représenter un élément non négligeable dans le cycle de transmission de *M. bovis* de l'environnement vers la faune.

III. Dépistage et diagnostic de la tuberculose bovine chez les bovins

1. Surveillance de la tuberculose bovine

L'objectif général de la surveillance de la TB en France est la détection des cas le plus précocement possible afin de parvenir à maintenir le statut OIT et à terme, l'éradication de la maladie.

a. Définition des cas

- Les animaux sont considérés comme infectés après la mise en évidence de *M. bovis* ou *M. caprae* soit par culture, par PCR ou par combinaison des tests post-mortem.
- Les animaux sont considérés comme suspects après la mise en évidence d'une réaction non négative à l'un des tests de dépistage utilisables du vivant de l'animal ou en cas de lésions observées à l'abattoir.

b. Dispositif de surveillance

Surveillance systématique à l'abattoir : tous les bovins sont examinés afin de rechercher de lésions évocatrices de TB dans les poumons, les nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens, trachéo-bronchiques et médiastinaux. Si des lésions sont découvertes, les organes et les nœuds lymphatiques sont prélevés par les vétérinaires sanitaires et soumis à un laboratoire vétérinaire départemental (LVD) agréé par la Direction générale de l'alimentation (DGAl) pour une recherche de mycobactéries par PCR et bactériologie. Le réseau français est constitué de 16 laboratoires formés par le Laboratoire national de référence pour la tuberculose (LNR) pour la bactériologie et la PCR.

Surveillance programmée en élevage : il s'agit du dépistage prophylactique qui conditionne l'acquisition et le maintien de la qualification officiellement indemne des troupeaux. Le rythme du dépistage est fonction de la situation sanitaire du département et va d'un rythme annuel dans les cas extrêmes comme la Côte d'Or à un arrêt total de prophylaxie lorsque la tuberculose bovine n'est pas présente (Figure 8a). Le pourcentage de bovins tuberculinés se concentre dans les régions fortement touchées par la TB. Ainsi, la campagne de prophylaxie est orientée dans le Sud-ouest, la Corse et le département de la Côte d'Or (Figure 8b). Cette surveillance peut être complétée par un dépistage lors des déplacements des animaux.
Dans tous les cas, le test de dépistage est soit l'intradermotuberculination simple (IDS) soit l'intradermotuberculination comparative (IDC).

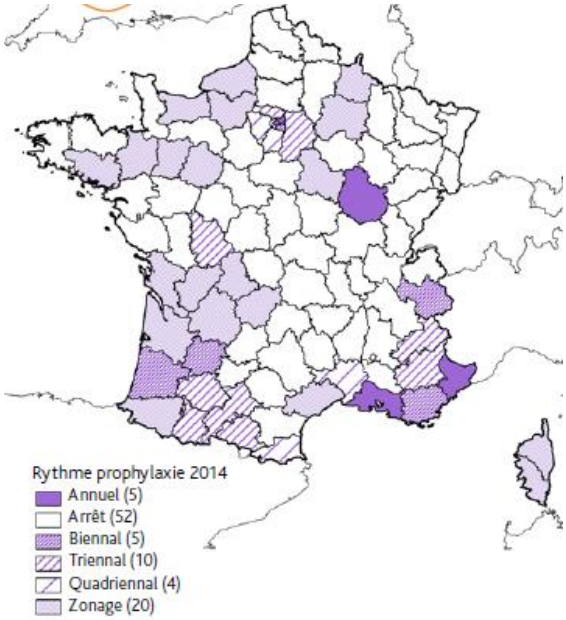


Figure 8a : Rythmes de dépistage prophylactique de la tuberculose bovine par département en 2014 (Cavalerie et al., 2014)

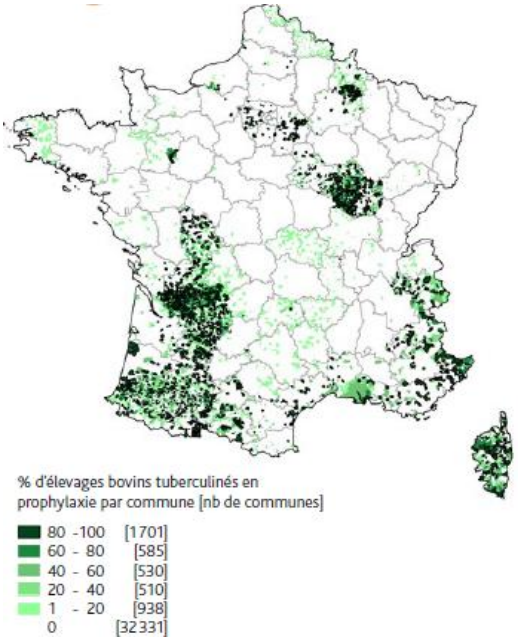


Figure 8b : Taux d'élevages bovins tuberculinés par commune en France en 2013 dans le cadre des campagnes annuelles de dépistage prophylactique (Cavalerie et al., 2014)

c. Gestion des suspicions

Lors de l'obtention de résultats non négatifs en élevage, la Direction départementale en charge de la protection des populations (DDecPP) réalise une analyse de risque pour en évaluer le niveau et tient compte du contexte épidémiologique. Au besoin, des tests complémentaires sont réalisés par IDC et/ou IFNɣ. Les animaux suspectés sont envoyés à l'abattoir et les ganglions (lésés ou pas) sont prélevés pour une recherche de mycobactéries par PCR et culture : il s'agit de l'abattage diagnostic. Lors d'infections confirmées, les troupeaux en lien épidémiologique avec un troupeau infecté sont recherchés, testés, abattus pour diagnostic. Ces cheptels sont suivis annuellement et sont classés à risque.

Lors de la confirmation de l'infection, l'exploitation doit être assainie par un abattage total ou partiel du cheptel (selon les cas), et par la désinfection des locaux.

En cas d'isolement d'une souche bactérienne suspecte par les LVD, l'identification de la souche est réalisée par le LNR de l'ANSES. Ce laboratoire peut aussi procéder directement aux recherches de mycobactéries lors de situations complexes. Le typage moléculaire des souches est également effectué par le LNR, permettant d'établir les relations entre les foyers.

Les groupements de défense sanitaire départementaux (GDS et FNGDS), créés il y a plus de 50 ans, assurent auprès des éleveurs un rôle d'information et de sensibilisation aux aspects sanitaires, doublé d'un rôle de mutualisation des coûts de la lutte pour les adhérents

La figure 9 représente l'ensemble des acteurs dans la lutte contre la tuberculose bovine.

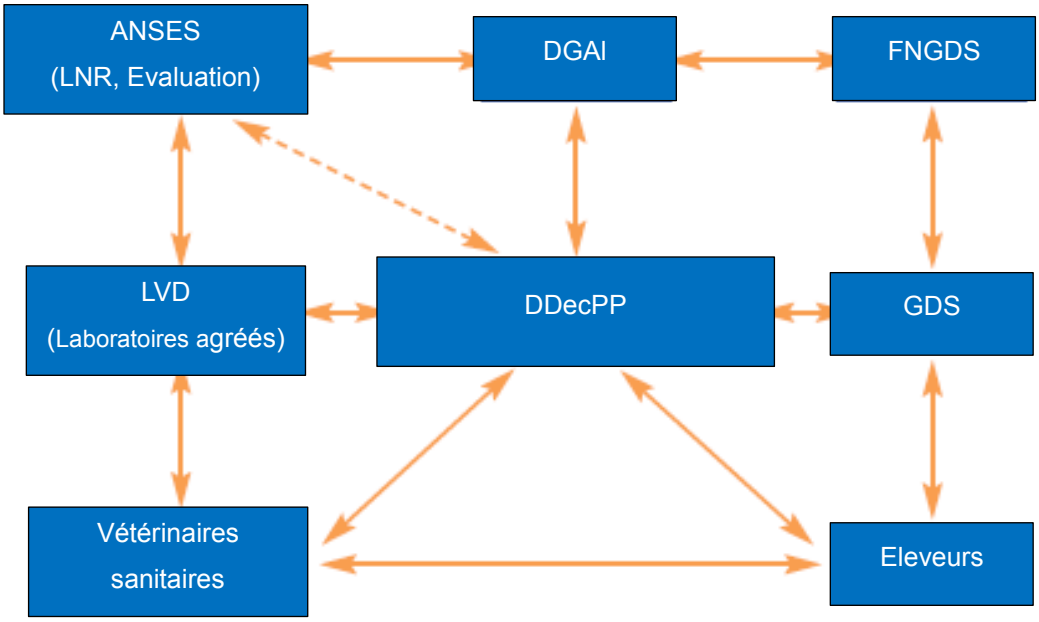


Figure 9 : Acteurs de la lutte contre la TB

LVD : laboratoires vétérinaires départementaux ; LNR : laboratoire national de référence ; DGAl : Direction générale de l'alimentation ; DDecPP : Direction départementale en charge de la protection des populations ; FNGDS/GDS : Fédération nationale des groupements de défense sanitaire départementaux (adapté de Favre et al., 2006).

2. Les outils de 1ère intention ante mortem
    a. Les intradermotuberculinations (IDT)

Les tests de première intention se basent sur l'étude de la réponse immunitaire (RI) de l'animal sensibilisé *in vivo* (intradermotuberculination) ou *in vitro* (interféron gamma IFNɣ) et plus particulièrement de la RI à médiation cellulaire (Figure 10). Dans le cas d'une infection à *M. bovis*, la RI à médiation humorale intervient dans un second temps (figure 10). Selon le contexte épidémiologique, les tests de dépistage utilisés varient afin d'obtenir le meilleur rapport sensibilité/spécificité.

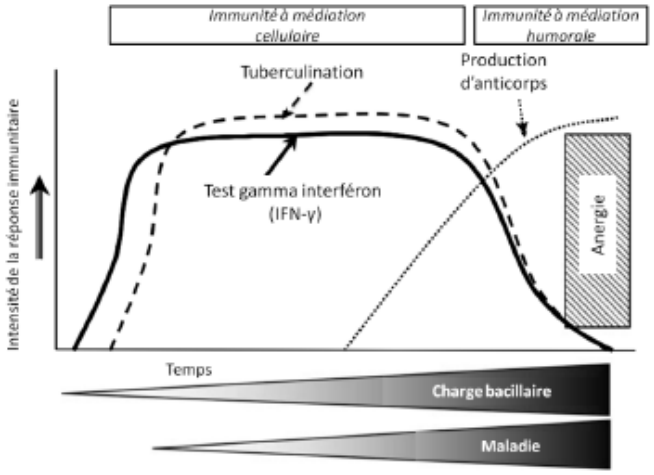


Figure 10 : Schéma de la réponse immunitaire chez le bovin infecté en lien avec les tests de dépistage de la tuberculose bovine (de la Rua-Domenech et al., 2006)

L'intradermotuberculination ou hypersensibilité retardée (HSR) est basée sur l'étude d'une réaction allergique de l'animal à un complexe protéique, la PPD (protéines purifiées dérivatives) bovine ou aviaire. Les PPD sont injectées, dans un premier temps, dans l'encolure de l'animal. Puis 3 jours plus tard une lecture sur le site d'injection détermine s'il y a une RI en mesurant le pli de peau à l'aide d'un cutimètre. Deux types d'IDT sont pratiqués sur le terrain.

- L'IDS est un test sensible mais avec une spécificité incomplète. Seules les PPD bovines sont utilisées pour cette méthode et ne permet pas de distinguer les réactions positives dues à *M. bovis*, à *M. avium* subsp *avium* (bactérie largement répandue responsable de tuberculose aviaire), *M. avium* subsp *paratuberculosis* (bactérie responsable de la paratuberculose) ou aux mycobactéries non tuberculeuses (bactéries environnementales). En effet, bien que produits à partir d'une souche de *M. bovis*, des antigènes communs entre cette espèce et d'autres mycobactéries infectieuses peuvent provoquer des réactions non spécifiques lors de l'inoculation de ce réactif. (Boireau, 2015)
- L'IDC permet notamment de distinguer les infections dues à *M. avium* subsp *paratuberculosis* ou à *M. avium* subsp *avium,* en utilisant les PPD aviaires et bovines. En effet pour réaliser ce test il est comparé la réaction de l'animal face aux PPD aviaires et bovines.

- L'interprétation du résultat se fait à l'échelle du troupeau à l'aide d'un graphique qui représente l'ensemble des résultats du troupeau et permet de déterminer si l'animal est positif ou non. (Boireau, 2015)

Selon le contexte épidémiologique de la région, seule l'IDS est pratiquée. Si un résultat non négatif est observé, une IDC sera réalisée 6 semaines plus tard.

Dans les régions à très forte prévalence comme la Côte d'Or, l'IDC est pratiquée directement. Les résultats de ces tests sont sous réserve de l'état d'avancement de la maladie et du statut immunologique de l'animal. En effet lorsque la maladie est très avancée, la RI à médiation humorale prend le relai et n'est plus détectable par ce type de test (anergie post tuberculeuse) (figure 10). À l'inverse lorsque le test est pratiqué à un stade trop précoce de la maladie le système immunitaire ne réagit pas encore (ante allergie). La fiabilité du test peut également être influencée par des facteurs de stress et traitement médicamenteux ou *post-partum* (Boireau, 2015).

b. Le dosage de l'interféron gamma

Ce test est basé sur la mesure de la quantité d'interféron produit par les lymphocytes T des animaux, en utilisant la technique ELISA (e*nzyme linked immunosorbent assay*). La « mémoire » des lymphocytes T des animaux infectés est alors utilisée en laboratoire, qui sont stimulés par un antigène spécifique de la tuberculose bovine et produisent cette interleukine.

Plusieurs types d'antigènes sont utilisés pour la stimulation :

- Les PPD bovine et aviaire : ces extraits protéiques ont l'inconvénient de manquer de spécificité.
- Les protéines ESAT 6 (*early secretory antigenic target* 6 kDa) et CFP 10 (*culture filtrate antigen* 10 kDa) : retrouvées chez les mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis* responsables de la TB (*M. bovis*, *M. caprae*).

Cette méthode est plus simple que les méthodes traditionnelles IDT pour les acteurs sur le terrain ; en revanche, l'analyse doit être effectuée au maximum 8 h après la prise de sang. Utilisé en série avec l'IDT ; il n'est pas nécessaire d'attendre 6 semaines entre un premier test et un deuxième test IFNɣ ; ce test est aussi sensible que l'IDS et aussi spécifique que l'IDC (tableau 9) lorsque les antigènes ESAT 6 et CFP 10 sont utilisés.

La positivité à ces deux tests conduit à l'abattage diagnostique de l'animal, à l'inspection de la carcasse pour déceler d'éventuelles lésions typiques, aux examens d'histologie (si lésion), et à la mise en culture de la souche pour son identification. Ces tests sont utilisés en parallèle ou en série suivant le contexte épidémiologique de la région (Boireau, 2015)

Tableau 9 : Spécificité et sensibilité des tests utilisés dans le diagnostic de la TB (Keck et al., 2014)

Type de test	Sensibilité	Spécificité
IDS	83.9 %	96.8 %
IDC	80 %	99.5 %
IFNɣ (PPD)	87.6 %	96.6 %
Histologie	93.6 %	83.3 %
PCR	87.7 %	97.0 %
Culture	78.1 %	99.1 %

3. Tests post mortem de 1ère intention utilisés en France
    a. L'histologie

Lors de l'inspection de routine à l'abattoir sur des animaux considérés OIT ou sur des animaux envoyés à l'abattoir pour abattage diagnostique, les ganglions ou d'autres organes présentant des lésions évocatrices de TB sont prélevés et analysés dans un premier temps par une méthode de coloration sur coupe à l'Hématoxyline-Eosine. Cette méthode met en évidence les cellules du tissu en colorant respectivement le noyau et le cytoplasme.

Par ce biais, on observe notamment les cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Dans le cas d'une tuberculose, la présence de « lésions évocatrices de tuberculose » est vérifiée. Elles sont principalement identifiées par l'observation de cellules géantes de Langhans et ou de granulomes. Ces cellules sont le reflet d'une réaction inflammatoire typique de mycobactérioses ou d'actinomycoses, mettant en scène une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les cellules géantes de Langhans sont le résultat de la fusion de plusieurs cellules et possèdent plusieurs noyaux disposés en forme de fer à cheval. L'évolution de la lésion est complexe et aboutit parfois à sa caséification. Le caséum est une substance grise ou blanche résultant de la nécrose des tissus et apparaissant avant la formation du granulome. La caséification de la lésion est très caractéristique de la tuberculose et n'est pas observée dans les autres types de réactions inflammatoires.

Cette méthode est sensible mais peu spécifique (tableau 9). En effet, des infections dues à d'autres MNT et même d'autres actinomycétales peuvent conduire à une fausse déclaration de suspicion de tuberculose. Elle est encore aujourd'hui au cœur du diagnostic de la tuberculose bovine.

    b. La bactériologie

La mise en culture des mycobactéries, longue et difficile, est réalisée selon la norme NF-U47-104 « Recherche et isolement de mycobactéries du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* chez les mammifères ». Les bactéries sont cultivées sur des milieux synthétiques enrichis de type Löewenstein-Jensen ou Coletsos.

Leur développement est lent (six à huit semaines) et nécessite une décontamination du prélèvement préalablement broyé à l'acide sulfurique suivi d'une neutralisation à la soude. Ce traitement a pour objectif l'élimination de la flore bactérienne initiale du prélèvement dont le développement plus rapide, pourrait contaminer le milieu. Le traitement décontaminant provoque également la destruction d'une grande partie des mycobactéries pouvant conduire à un résultat négatif. La norme est appliquée par l'ensemble des laboratoires agréés du réseau qui envoient les isolements obtenus au LNR pour identification et typage. Cette méthode est encore aujourd'hui la méthode de référence pour l'identification et le typage de *M. bovis*. Bien que très spécifique et assez sensible (tableau 9), l'obtention de la souche est un processus long. Un prélèvement est déclaré négatif au bout de 3 mois ce qui implique que la chaîne de diagnostic soit extrêmement longue (6 mois).

c. La PCR

La PCR (P*olymerase Chain Reaction*) est une méthode de biologie moléculaire basée sur l'amplification exponentielle d'une région d'ADN. Elle est utilisée en 1ère intention pour l'identification du MTBC directement sur un d'ADN extrait à partir des tissus infectés.
Sur les broyats des prélèvements, une extraction d'ADN via l'utilisation du kit Qiamp DNA mini kit (Qiagen) est réalisée par les laboratoires agréés du réseau. Les éluats obtenus sont analysés par PCR via un kit commercial (LSI VetMAX *Mycobacterium tuberculosis* Complex Real-Time PCR) qui est validé et contrôlé par le LNR. Ce test cible la séquence IS*6110*, commune à toutes les mycobactéries du MTBC. À l'issu de l'analyse tous les ADN positifs extraits de prélèvements de la faune sauvage ou de bovins (à la demande des DDecPP) sont envoyés au LNR pour identification et typage moléculaire.
Bien qu'elle présente des avantages non négligeables (rapidité, sensibilité, spécificité) (tableau 9) la PCR sur prélèvement est aujourd'hui utilisée en support des méthodes de référence (histologie et bactériologie) pour l'identification de *M. bovis.* La PCR ne constitue pas un élément suffisant, lorsqu'elle est utilisée seule, pour orienter le schéma diagnostic.

4. Situation des élevages bovins

La mise en place d'une lutte contre la tuberculose bovine organisée depuis 1955 a permis à la France d'être reconnue officiellement indemne de tuberculose bovine depuis 2001 par l'Union Européenne, ce qui correspond au respect de 3 critères :

- La prévalence annuelle des troupeaux infectés est inférieure à 0.1% pendant 6 ans
- Le taux de troupeaux officiellement indemnes est supérieur à 99.9% pendant 6 ans au 31 décembre de chaque année
- La réglementation européenne relative à la tuberculose (Directive 64/432) est respectée

Depuis les années 90, une diminution nette de la prévalence de la tuberculose bovine est observée en France. Cependant depuis 2011, date à laquelle le système de lutte s'intensifie, on observe une augmentation constante de la prévalence. En 2015, le taux de prévalence avoisinait les 0.09% (figure 11).

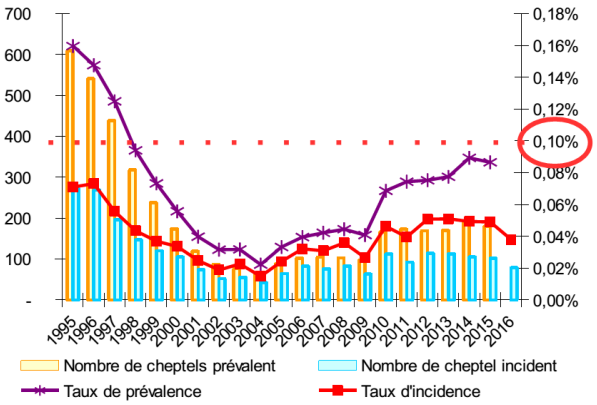


Figure 11 : Évolution de la prévalence et de l'incidence de la tuberculose bovine de 1995 à 2016 (source d'information : DGAl)

Cette situation met en péril le statut indemne de la France au regard de la tuberculose bovine avec pour conséquence en cas de perte du statut, l'interdiction d'exporter des bovins et des produits dérivés. Dans le reste de l'UE, l'Allemagne, l'Autriche, la Belgique, le Danemark, la Finlande, le Luxembourg, la Norvège, les Pays-Bas, la Pologne, la République Tchèque, la Slovaquie, la Slovénie, la Suisse et la Suède et une partie de l'Italie sont aussi des pays reconnus indemnes de tuberculose bovine. L'Espagne, l'Irlande et la Grande Bretagne sont les 3 pays où la prévalence de tuberculose bovine est la plus élevée (respectivement : 1.3%, 4.2%, et 11.5% en 2011) (ANSES, 2011).

Dans la faune sauvage, l'échantillonnage ne permet pas de connaître la prévalence populationnelle. En effet la surveillance de la faune sauvage pour cette maladie est rythmée par la présence de foyers bovins dans les mêmes zones créant un biais dans le niveau et la sélection des zones à surveiller.

IV. Surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage

Considérant le caractère multi-hôte de *M. bovis* et le caractère insidieux de la tuberculose, la transmission entre les animaux de rente et la faune sauvage ne peut pas être écartée. Jusqu'en 2011, il n'existait pas de système de surveillance homogène et standardisé de la tuberculose bovine dans la faune sauvage en France.

Depuis, un dispositif de surveillance harmonisé et renforcé à l'échelle nationale sur les blaireaux, les sangliers et les cerfs a été mis en place : il s'agit du réseau Sylvatub (rivière Julie et al., 2013). Il permet d'effectuer une surveillance évènementielle ou programmée suivant le niveau de risque d'infection du département (figure 12). Ce risque est déterminé par la présence de foyers (sporadiques ou groupés), la présence d'animaux sauvages infectés ou le type de foyers (nombre d'animaux infectés/foyers, présence et type de lésions)

Modalités de surveillance	Niveau 3	Niveau 2	Niveau 1
Surveillance des cervidés et des sangliers porteurs de lésions suspectes détectés par l'examen initial de la venaison	X	X	X
Surveillance des sangliers, des cervidés et des blaireaux prélevés par SAGIR	X	X	X
Renforcement du réseau SAGIR en zone infectée	X	X	
Surveillance des cadavres d'espèces sensibles signalés sur les routes	X	X	
Surveillance active des blaireaux en zone infectée	X	X	
Surveillance active sur les cerfs et les sangliers tués à la chasse	X		

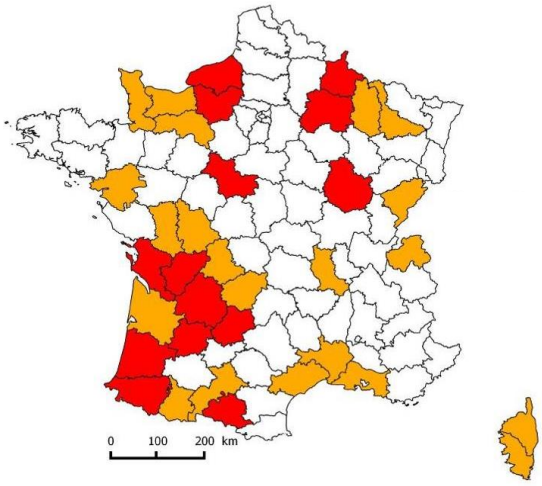


Figure 12 : Modalité de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage (DGAL, 2011) **;**(DGAL, 2016)

D'une façon générale, les ganglions d'un l'animal suspect sont prélevés et rassemblés en un pool et une extraction d'ADN suivie d'une PCR sont réalisées dans les mêmes conditions que pour le diagnostic chez les bovins. Si la PCR est positive, le broyat est mis en culture. Lorsque l'on est en présence d'un animal qui présente des lésions, une PCR spécifique de la TB est réalisée sur le tissu lésé. Le broyat est mis en culture si la PCR s'avère positive.

V. Typage moléculaire du MTBC

Le génotypage des souches de *M. bovis* permet d'étudier la dynamique de la tuberculose bovine et de mieux comprendre sa nature complexe en apportant des éléments pour déterminer l'origine des foyers. Les mycobactéries du MTBC, dont *M. bovis,* sont d'excellents micro-organismes pour réaliser des études d'épidémiologie moléculaire sur la base de leurs caractères génotypiques. En effet, du fait de leur reproduction asexuée et de l'absence d'échanges de matériel génétique entre elles, ces mycobactéries sont très clonales, c'est-à-dire qu'elles conservent des caractéristiques identiques à leur ancêtre le plus récent. Si une de ces bactéries passe d'un animal à un autre, elle conserve toutes ses caractéristiques génotypiques dans le nouvel hôte. Si une souche subit des mutations génétiques dans la région ciblée par le génotypage, celui-ci est donc capable de la différencier de son ancêtre : on considère alors qu'il s'agit d'un nouveau clône. Si deux animaux sont atteints de tuberculose et qu'une bactérie de génotype différent est isolée chez chacun d'eux, on peut ainsi en déduire qu'il n'y a pas eu de transmission entre eux, même s'ils ont été en contact étroit. La technique de génotypage utilisée doit être en relation avec le taux de variation génétique de la bactérie. Dans le cas de la tuberculose bovine et en particulier de *M. bovis*, deux méthodes de génotypage sont largement utilisées : le spoligotypage et le typage VNTR (*variable number tandem repeat*), qui permettent d'établir une différenciation entre souches en tenant compte d'une relative stabilité génétique. La combinaison de ces deux techniques permet une différenciation très fine des souches (Hauer et al., 2015).

1. Le spoligotypage

a. CRISPR

La région **C**lustered **R**egulary **I**ntersperced **S**hort **P**alindromic **R**epeats, ou CRISPR, a été découverte en 1987 par une équipe japonaise dans leur étude sur le gène *iap* et a été décrite comme étant une succession de répétitions dont la fonction était inconnue (Ishino et al., 1987). Au début des années 90, cette région était utilisée pour différencier les souches entre elles, notamment pour *M. tuberculosis* et *Haloferax volcanii.* La fonction première de ce locus et les gènes associés sont déterminés dans les années 2000 (Barrangou and Marraffini, 2014 ; Louwen et al., 2014a ; Shariat and Dudley, 2014 ; Freidlin et al., 2017) .

Ils ont démontré par la suite que les bactéries étaient capables d'acquérir un mécanisme de défense adaptatif contre leurs prédateurs, les phages, plasmides et autres ADN transposables. Ce locus, avec les gènes associés *Cas* (CRISPR *associated gene*), est présent chez 50% des bactéries et 80% des *archae*. Il est assimilé à un système immunitaire et jouerait un rôle dans l'évolution bactérienne.

Lors d'une première infection par un phage, la bactérie intègre une portion de 24-47 pb de l'ADN infectant dans son génome (*spacer*) et duplique un motif également de 24-47 pb (*Direct Repat*) en amont du locus (zone dite « *leader* »). La bactérie acquiert ainsi une bibliothèque, obtient une mémoire des virus qu'elle rencontre et est capable lors d'une seconde infection de reconnaître l'ADN viral et de le détruire (Louwen et al., 2014b).

La zone CRISPR est organisée en opérons et est composée, entre autres, d'une alternance de *spacers* dont la séquence est variable, unique, spécifique d'un ADN viral et de séquences invariables « *Direct Repeat* » (DR). Une multitude de gènes codant pour des protéines *Cas,* nécessaires à l'intégration et à la dégradation des ADN infectants, sont associés.

Ce système naturel de défense est aujourd'hui un outil révolutionnaire dans le domaine de la biologie moléculaire avec notamment le système CRISPR-Cas9 (Tang et al., 2017 ; Gao et al., 2017).

b. Le génotypage via le spoligotypage

Le spoligotypage est une méthode qui permet à la fois de différencier les différentes bactéries du MTBC mais aussi les différentes souches de *M. bovis*. Mis au point en 1997, il est basé sur le polymorphisme de la région conservée CRISPR et permet à la fois d'identifier et de typer une souche. La technique repose sur l'amplification par PCR de la région DR possédant 43 *spacers* dont la position dans la région DR est très conservée. La caractérisation de la souche est basée sur la présence ou l'absence des 43 *spacers*. La recherche par hybridation de ces *spacers* permet d'obtenir un profil traduit par un code binaire à 43 entrées (0= absent, 1= présent).

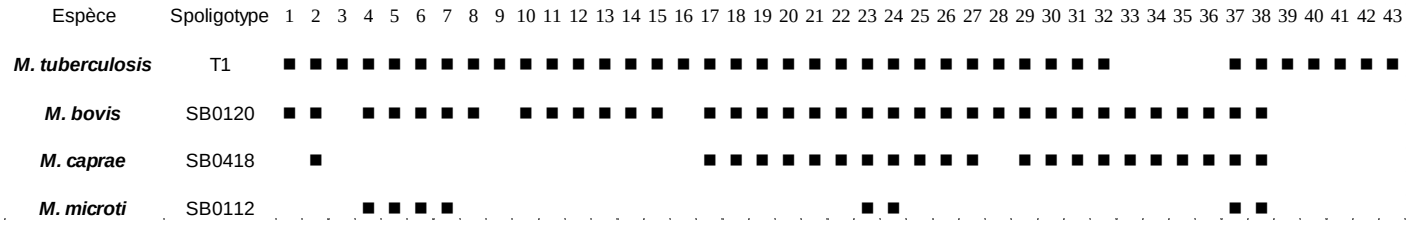
Ce code correspond à l'identification de la souche et est associé à un numéro international de type SBNNNN de la base de données http://www.Mbovis.org.

Dans toutes les souches des lignées animales, les *spacers* 39 à 43 sont absents ainsi que les *spacers* 3-9-16 (tableau 10). Le profil SB0120 est le plus complet de *M. bovis* et il est considéré comme étant « le type original » des autres souches d'un point de vue évolutif. En effet, l'évolution de la région DR est unidirectionnelle et se réalise uniquement par la perte de *spacers* dans la région.

Grâce au spoligotypage, on peut déjà orienter l'identification de l'espèce du MTBC puisque contrairement à *M. bovis*, *M. tuberculosis* possède les *spacers* 3-9-16-et 39 à 43.

Les autres espèces possèdent encore moins de *spacers* : Ainsi *M. caprae* ne possède pas le *spacer* 1 et les *spacers* 3 à 16. *M. microti* est l'espèce qui possède le moins de *spacers*. Elle possède cependant des profils bien particuliers, dont l'un des plus représentatifs est le SB0112 (tableau 10).

Tableau 10 : Profils spoligotypiques du MTBC



Un carré noir représente la présence du *spacer*, un carré blanc son absence

c. Méthodes de spoligotypage

Toutes les méthodes de spoligotypage sont basées sur la détection des *spacers* amplifiés par le biais d'une PCR des régions DR via le couple d'amorces Dra-biotinylé / Drb (figure 13). Trois technologies permettent la visualisation de la présence ou l'absence des produits PCR :

- La technologie en macro-arrays sur membrane
- La technologie en micro-arrays en phase solide
- La technologie en micro-arrays en phase liquide

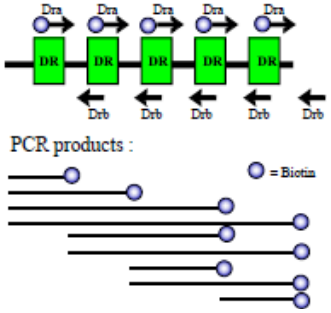


Figure 13 : Principe de l'amplification du spoligotypage

Amplification in vitro de l'ADN dans la région DR des bactéries du MTBC. L'utilisation des 2 amorces, Dra et Drb, pour l'amplification, conduira à l'amplification d'un *spacer* ou d'un *spacer* et la région DR associée. (Kremer et al., 1997)

i. Spoligotypage en macro-arrays sur membrane

La première étape consiste à hybrider une membrane avec les oligonucléotides complémentaires correspondant aux 43 *spacers* à l'aide d'un miniblotter doté de 45 canules. La membrane est ensuite retournée à 90° pour disposer, dans les canules, les amplicons marqués à la biotine par la PCR (figure 14a). La mise en évidence des points d'intersections, s'il y a présence d'une hybridation de séquences complémentaires, consiste en un traitement à la streptavidine-péroxydase suivi d'une révélation par autoradiographie via la dégradation du substrat de l'enzyme qui émet de la luminescence. Les spots noirs signifient que le *spacer* est présent, le spot blanc signifie son absence. L'interprétation des résultats est manuelle et comparée aux bases de données pour attribuer un code international de type SBNNNN (figure 14b). Cette méthode est la première à avoir été utilisée (Kamerbeek et al., 1997) et a permis la grande majorité des études de typage moléculaire du MTBC au niveau mondial.

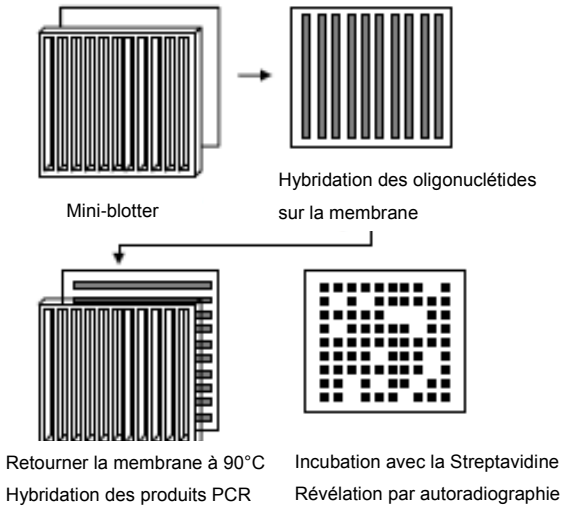


Figure 14a : Hybridation sur membrane (Kremer et al., 1997)

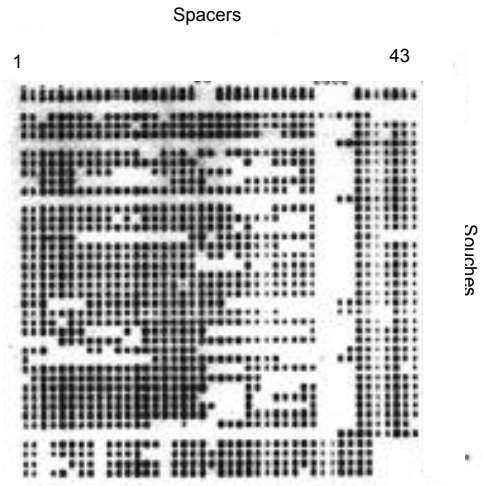


Figure 14b : Résultats du spoligotypage sur membrane (Kremer et al., 1997)

ii. Spoligotypage en micro-arrays en phase solide

Le principe consiste à hybrider sur une micro-puce de type « *Array-strip* » (Alere) (figure 15) les oligonucléotides complémentaires des régions DR, suivi de l'hybridation des produits PCR biotynilés. La révélation des couples amplicons-oligonucléotides (si le *spacer* est présent) est réalisée par le biais de la streptavidine conjuguée à la péroxydase qui dégrade son substrat en émettant une luminescence mesurée par un lecteur. Le traitement des données est automatisé et rendu en un code binaire : « 1 » signifie la présence du *spacer*, « 0 » signifie son absence. Ce code permet une comparaison avec des données présentes dans les bases de données (Ruettger et al., 2012).

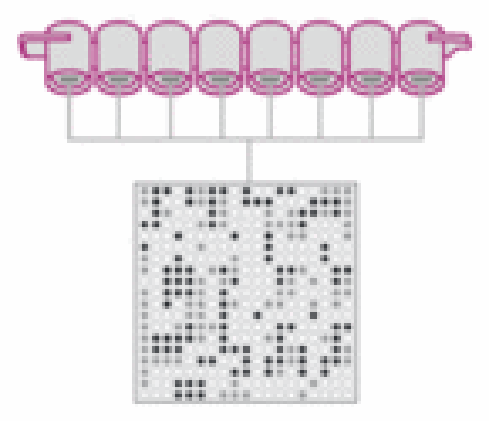


Figure 15 : Puce micro-arrays

Chaque cupule contient une micro-puce couplée aux oligonucléotides des *spacers*. La puce peut contenir jusqu'à 784 points.

iii. Spoligotypage en micro-arrays en phase liquide

- Le Bio-plex 200 (Bio-Rad)

Le Bio-Plex est muni de deux lasers se croisant en un même point, effectuant ainsi deux sortes de mesures sur une même entité : une microbille colorée qui sert de support d'attache (figure 16).
Le laser rouge excite la bille à 633 nm, elle émet dans le rouge et l'infrarouge à une longueur d'onde unique correspondant à la proportion en fluorochromes rouge et orange qui la composent. Ce ratio détermine ce que l'on appelle la région de la bille, ce qui la rend identifiable et comptabilisable par le logiciel lorsque, transportée par le système fluidique, elle passe par la porte. Un panel de 100 microbilles appartenant à 100 régions différentes est disponible, augmentant à 100 le nombre d'analyses par échantillon en une lecture de l'appareil.
Sur chaque type de billes est liée une molécule pouvant induire une interaction spécifique : Antigène-Anticorps ou complémentarité entre séquences d'acides nucléiques. Le contact entre les billes complexées et l'élément d'intérêt marqué, doit être réalisé selon la nature de leur mécanisme de liaison (incubation ou hybridation). Le résultat de ces réactions est quantifiable par le laser vert, qui excite le fluorochrome fixé au reporter, à 532 nm.

Après l'hybridation ou la formation du complexe immun, des lavages successifs éliminent les particules n'ayant pas interagi. Un résultat positif se traduit par un niveau de fluorescence élevé, un résultat négatif par un faible niveau de fluorescence. La détermination du seuil de positivité pour chaque méthode et/ou session d'analyse est primordiale pour l'interprétation des résultats. Ici sur 43 types de billes sont fixés les oligonucléotides correspondant aux 43 *spacers*. Après l'amplification, une étape de déshybridation/hybridation est nécessaire pour la réalisation de ce test.

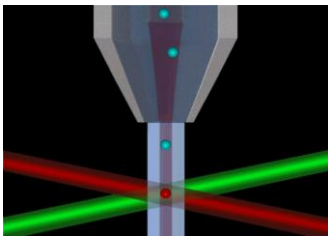
Cellule de lecture	Le bio-plex 200
635 nm 532 nm 	

Figure 16 : Le bio plex 200

La cellule de lecture est composée des 2 lasers (vert et rouge), le bioplex est ensuite constitué d'une plateforme (1), du bloc haut qui gère le réseau de tubulures (2) et d'un module qui gère la pression des fluides (3)

- Révélation en phase liquide

Après amplification, les amplicons de chaque souche sont mis en présence des billes magnétiques couplées aux séquences complémentaires des *spacers*, une dénaturation suivie d'une hybridation permet la formation d'un complexe bille-*spacer* biotinylé. La streptavidine phycoérythrine (SAPE) révèle ce complexe via la biotine. Le luminex achemine les 43 types de billes vers le laser rouge qui repère, identifie la bille et le laser vert qui excite la SAPE fixée à la biotine. L'appareil retranscrit les résultats sous forme d'unités de fluorescence (UF). Par cette étude, un profil génétique est obtenu, permettant de caractériser et d'attribuer à la souche un type SBNNNN via la base de données. (Zhang et al., 2010)

d. Situation en Europe

En Europe, 2 types de souches majoritaires sont observées : le groupe clonal European 1 (Eu1) et le groupe clonal European 2 (Eu2). Ces deux groupes sont caractérisés entre autres par l'absence du *spacer* 11 et 21 respectivement (Smith et al., 2011 ; Rodriguez-Campos et al., 2012). Les échanges commerciaux entre pays de l'UE contribuent à la diversité génétique retrouvée en France (Figure 17a et b). Malgré tout, seulement 30% des souches sont partagées entre la France et le reste de l'UE. Selon toute vraisemblance, peu de bovins provenant du reste de l'UE ont été importés au Royaume-Uni (qui n'est pas OIT), la réciproque s'appliquant également.

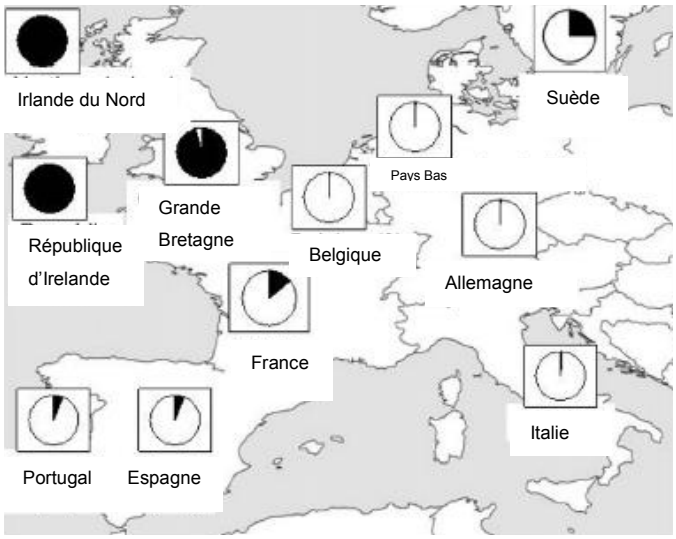


Figure 17a : Répartition géographique du complexe Eu1 en Europe. (Smith et al., 2011)
Noir : complexe Eu1 ; Blanc : autres

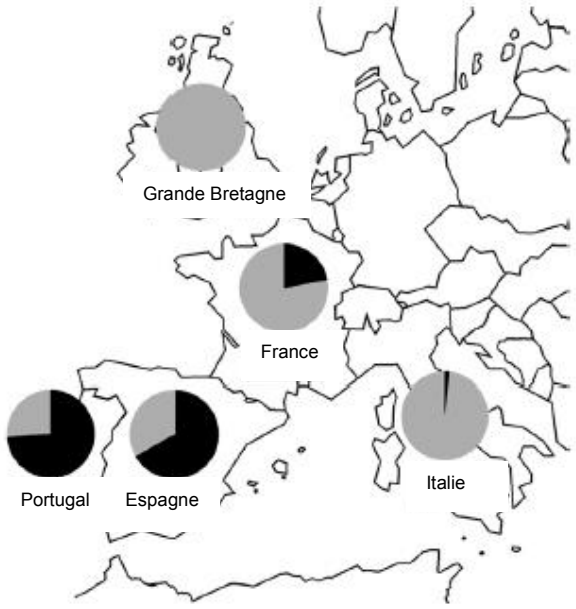


Figure 17b : Répartition géographique du complexe Eu2 en Europe de l'Ouest. (Rodriguez-Campos et al., 2012)
Noir : complexe Eu2 ; Gris : autres

e. Situation en France

En France, 153 spoligotypes sont recensés (Hauer et al., 2015) dont 3 sont prédominants et représentent 42.2% des souches de *M. bovis* : SB0120 (30.4%), SB0134 (11.8%) et SB0121 (6.2%).
Le profil SB0120 est principalement retrouvé dans le centre de la France, en Dordogne et en Côte d'Or aussi bien dans la faune domestique que sauvage. Le profile SB0134, est essentiellement présent dans le nord de la France et en Côte d'Or. Le profile SB0121 est représenté dans toute la France, sans localisation régionale particulière et seulement chez les bovins (figure 18).

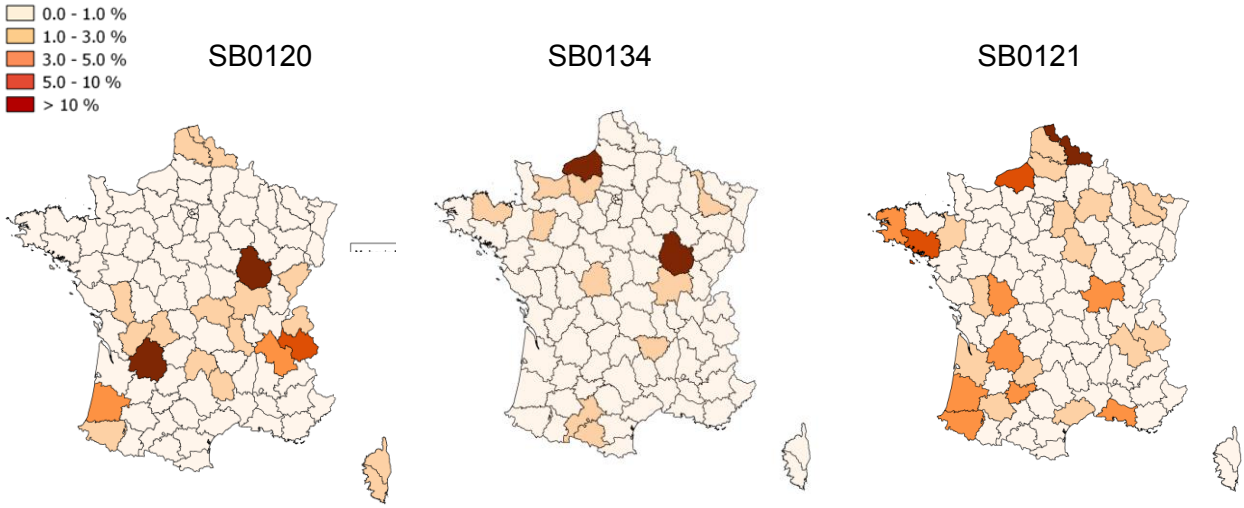


Figure 18 : Répartition géographique des 3 profils spoligotypes prédominants en France (Hauer et al., 2015)

2. Le typage VNTR ou MLVA

L'étude des VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), ou *Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis* (MLVA) (Sola et al., 2003 ; Supply et al., 2011) ; est une méthode de typage fiable chez les mycobactéries. Il s'agit de l'analyse du nombre de répétitions d'un motif connu pour un locus donné par PCR et de la transcription de la taille de l'amplicon obtenu en nombre de motifs présents. Plus le nombre de loci étudié est élevé, plus la discrimination de la méthode augmente. Au LNR, 8 loci (ETR A, ETRB, ETRC, ETRD, QUB 11a, QUB 11b, QUB3232, QUB 26) sont étudiés pour le typage des souches de *M. bovis* en se basant sur la littérature (Rodriguez-Campos et al., 2013 ; Hauer et al., 2016), le consortium VenoMyc (2006) et les données du LNR pour estimer la combinaison la plus discriminante. Par le biais de cette méthode, un « code barre » de la souche représentant le nombre de répétitions présent est établi pour chaque locus (ex : 5 4 4 3 2 5 4 7).

3. Diversité génétique des souches de *M. bovis* françaises

La France est au cœur des échanges commerciaux en Europe. Le pays possède une diversité génétique de *M. bovis* provenant de sources très variées (figure 19). L'étude par spoligotypage et VNTR des souches détenues par le laboratoire (de 1978 à 2011) a mis en évidence la présence de 540 profils différents et la présence de groupes clonaux, avec notamment l'identification de la famille F4 caractérisée par l'absence du *spacer* 33 et par un locus VNTR tronqué (figure 20). Cette famille F4 est principalement localisée dans le Sud-Ouest de la France et regroupe les spoligotypes SB0821, SB0825 et SB0840 (Hauer et al., 2015).

L'association des 2 méthodes permet de différentier d'avantage de souches que chaque méthode indépendamment. Ainsi, pour les 3 spoligotypes majoritaires présents sur le territoire, le typage VNTR permet de différencier 146 profils VNTR au sein du groupe SB0120, 51 profils au sein du groupe SB0134 et 45 profils au sein du groupe le SB012. Cette caractérisation précise des souches aide à la reconstruction de possibles séquences d'infection, très difficiles à établir pour une maladie comme la tuberculose où l'animal peut héberger le bacille parfois pendant de longues périodes et être contagieux sans pour autant être identifié comme étant infecté. Si des informations épidémiologiques en lien avec un foyer sont disponibles, une chaine de transmission peut éventuellement être établie.

L'étude montre également une évolution dans la diversité génétique de *M. bovis* ces 30 dernières années. Le nombre d'isolats augmente avec la mise en culture systématique des prélèvements et la prévalence diminue grâce au plan de lutte, ce qui explique la diminution de la diversité génétique depuis 2002 (Figure 19).

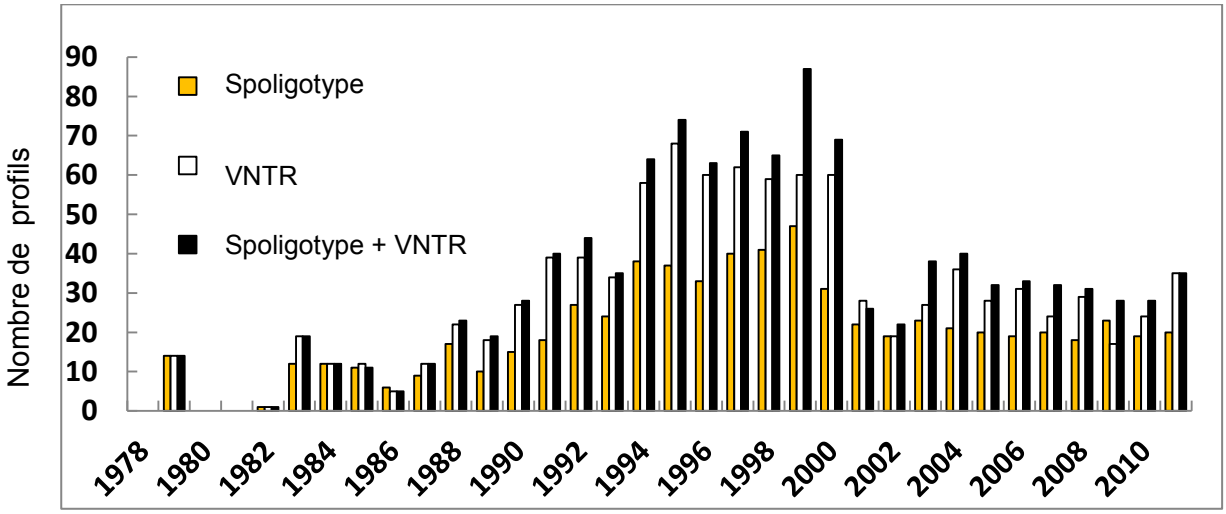


Figure 19 : Distribution du nombre de génotypes en fonction du temps en France (Hauer et al., 2015)

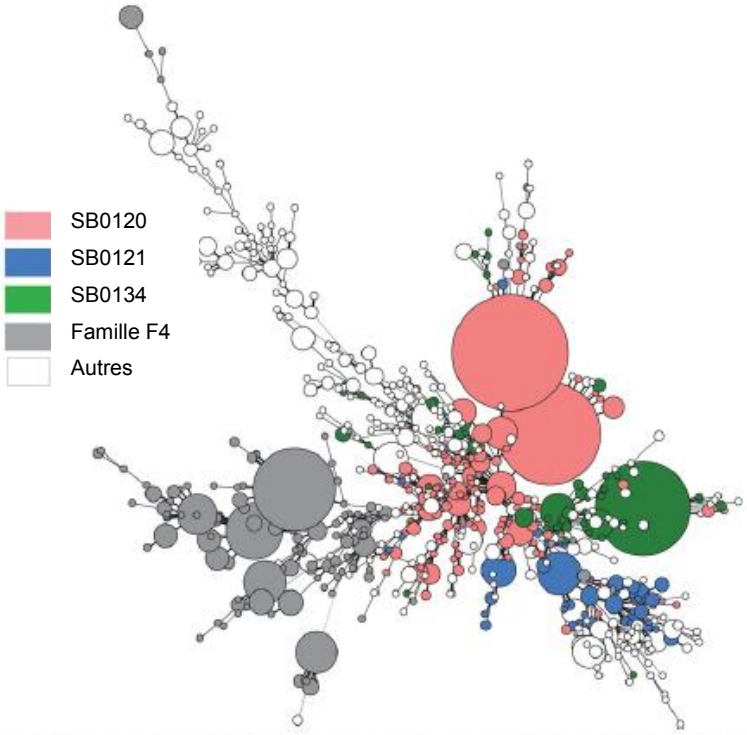


Figure 20 : *Minimun spanning tree* réalisé avec 2 332 souches de *M. bovis* isolées entre 1978 et 2013 (Hauer et al., 2015)

706 génotypes ont été obtenus par combinaison du spoligotypage et du typage VNTR. Les clusters colorés représentent les principales familles de *M. bovis* en France SB0120 (rose), SB0121 (bleu), SB0134 (vert), famille F4 (gris)

Chapitre 2 : Objectifs

I. Problématique

Le diagnostic de la TB est lourd et les défauts de sensibilité / spécificité des tests de dépistage fragilisent considérablement le plan de surveillance. Le schéma décisionnel pour le dépistage de la tuberculose bovine implique l'interprétation de l'ensemble des résultats générés par différentes méthodes de diagnostic en lien avec les données contextuelles. Les tests ante-mortem sont réalisés au sein des cheptels suivant le calendrier et le rythme de prophylaxie selon le calendrier de chaque département. À cette étape, les animaux non négatifs entrent dans le système de diagnostic classique avec le déclenchement de l'Arrêté Préfectoral de Mise sous Surveillance (APMS) du cheptel d'origine du bovin suspecté d'être infecté par la TB. L'animal est envoyé à l'abattoir pour abattage diagnostique où la carcasse est examinée. Les tissus sont analysés par histologie, bactériologie, et PCR. Cette longue procédure d'analyse peut demander jusqu'à 6 mois entre la mise en APMS du cheptel et le résultat définitif de la bactériologie (*M. bovis* est une bactérie à croissance lente). Pendant ce temps, l'éleveur n'est plus autorisé à vendre le lait cru, ni à importer ou exporter des animaux. Au regard du contexte de la maladie en France, il est nécessaire de mettre en place des outils diagnostiques qui permettent d'établir un diagnostic fiable, rapide et efficace tant en santé animale que d'un point de vue environnemental.

II. Projet d'étude

Dans le cadre des missions du LNR tuberculose à l'ANSES qui consiste à apporter des **conseils pertinents aux autorités sanitaires** face à cette crise, qui nécessite une **surveillance adaptée** en se basant, entre autres, sur l'utilisation de **méthodes de détection optimisées,** les axes principaux de notre activité sont :

- **la recherche et le développement de méthodes** permettant une connaissance accrue de la maladie et des mycobactéries circulant dans notre pays,
- **l'animation du réseau de laboratoires agréés pour la tuberculose bovine,**
- **la validation** ainsi que **la standardisation de méthodes de diagnostic,** transférées aux 16 laboratoires agréés.

Comme exposé précédemment, le diagnostic de la TB repose sur l'identification de *M. bovis*. Les méthodes de biologie moléculaire décrites pour la caractérisation du MTBC et des MNT ont montré l'efficacité, la simplicité, la spécificité et la sensibilité de la technique PCR. L'analyse combinée des différentes régions et cibles génétiques spécifiques permet d'augmenter le pouvoir discriminant du système. Des cibles génétiques stables et spécifiques sont utilisées pour la caractérisation de mycobactéries d'intérêt et sont appliquées aux prélèvements issus d'élevages et de la faune sauvage, mais également issus de l'environnement.

Dans le cadre de cette étude, nous avons souhaité identifier/détecter les MNT (dont la plus commune est *M. nonchromogenicum*), le complexe de *M. avium* et différencier la souche vaccinale (BCG) des souches terrain, pour *M. bovis,* par le biais de la PCR en temps réel.
D'autre part, pour faire face à la crise actuelle de la TB et répondre de façon précise et rapide, la caractérisation intra-MTBC est axée sur la détection/identification par la PCR en temps réel, mais également par le spoligotypage sur Luminex qui allie l'identification de l'espèce et l'obtention de données épidémiologiques.

Pour cette étude, 3 volets ont été développés,

- ✓ la **validation** de 9 systèmes **PCR** permettant d'identifier directement des mycobactéries d'intérêt
- ✓ l'**optimisation** de la méthode de **spoligotypage** par Luminex afin de la rendre directement applicable aux prélèvements pathologiques
- ✓ l'**optimisation** d'un système global de **détection moléculaire** pour tout type de prélèvement

Dans ce mémoire, le chapitre 2 sera consacré à la mise en place des systèmes de détection et à leur validation.
Les chapitres 3 et 4 sont consacrés à la description de l'utilisation de ces systèmes, dans des cas concrets de notre laboratoire :
Le chapitre 3 portera sur l'analyse de 3 articles utilisant ces méthodes pour la discrimination du MTBC via :

- la mise en évidence de la circulation de la souche vaccinale dans les tissus de blaireaux pour la mise en place d'un vaccin oral chez le blaireau en Europe (article en cours de rédaction)
- la mise en évidence de *M. bovis* dans l'environnement
- la mise en évidence des infections animales à *Mycobacterium microti*

Le chapitre 4 illustrera l'application des méthodes par l'analyse d'un article et par la caractérisation des souches de mycobactéries MNT via :

- l'étude des échantillons Histologie +/ PCR –
- la caractérisation des souches de mycobactéries non tuberculeuses qui peuvent générer des résultats non spécifiques aux tests ante-mortem

Chapitre 3 : Développement des systèmes de détection et de typage moléculaire pour la TB

I. Matériel et méthodes

1. Échantillons utilisés et extraction

Le matériel génétique utilisé des ADN est issu des activités de référence du LNR qui se déclinent en 4 types d'extraits :

- des thermolysats de souches de *M. bovis* et d'autres mycobactéries après la mise en culture de tissus positifs
- des éluats d'ADN extraits des prélèvements positifs
- des éluats d'ADN d'extraits de prélèvements positifs à l'histologie mais négatifs à la PCR de première intention
- d'un ADN extrait d'une suspension bactérienne par la technique phénol/chloroforme, d'une souche isolée d'un animal de la faune sauvage, provenant du foyer de tuberculose détecté dans la forêt de Brotonne.

Dans les deux premiers cas et de manière aléatoire, les tissus sont des ganglions mésentériques, trachéobronchiques, rétropharyngiens, médiastinaux ou proviennent de lésions d'organes pour les bovins. Pour la faune sauvage, c'est un mélange de tissus le plus souvent.

a. Extraction d'ADN de souches

Les laboratoires agréés pour le diagnostic de la TB traitent les prélèvements en suivant la norme NF U 47-104 qui prévoit le broyage de maximum 5 g de tissus, d'une décontamination à l'acide sulfurique (H_2SO_4 10 %) suivi d'une neutralisation à la soude (NaOH 4 %). Les surnageants de broyats sont ensemencés sur des milieux solides spécifiques et incubés pendant 3 mois à 37°C. Les souches isolées dans les laboratoires du réseau sont envoyées au LNR pour identification moléculaire de l'espèce et du génotypage. À leur réception, le LNR ensemence 9 mL de milieu liquide Middlebrook 7H9 avec la primo culture, puis l'incube à 37°C de quelques jours à 1,5 mois jusqu'à l'obtention d'une charge bactérienne riche. Une partie de la suspension est alors placée en souchothèque et l'autre partie est traitée pour une identification moléculaire.

La suspension est chauffée à 80°C pendant 1 h pour l'inactivation de la bactérie, puis centrifugé 15 min à 3000 g. Le culot est ensuite rincé par 1 mL de NaCl à 150mM, centrifugé 5 min à 18000 g et repris dans 100 µL de TE (10 ,1).

b. Extraction d'ADN sur prélèvement

L'ADN des broyats obtenus à partir des prélèvements sont extraits soit par les laboratoires agréés via le protocole exposé précédemment (paragraphe III, 3, c), soit par le LNR via le kit « High Pure PCR Template Préparation Kit » (Roche).

2. Mise en place de la PCR en temps réel
   a. Design des oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été dessinés par l'alignement de séquences de mycobactéries issues

- du séquençage du gène *hsp65* (McNabb et al., 2004) (données du LNR)
- de la base de données NCBI pour le *design* des oligonucléotides sur les gènes RD1 et IS*1245* (*accession number* : U35019/U34848 et L33879)

Les séquences sont alignées via le logiciel Multalign et les couples amorces/sondes sont dessinées sur des zones spécifiques. Les amorces et sondes ont une taille comprise entre 15 et 20 nucléotides avec une « *Temperature melting* » compris entre 57 et 61 °C pour les amorces et 66 à 69°C pour les sondes, avec un GC% le plus faible possible lors du *design*. Une attention particulière est apportée aux structures secondaires de chaque oligonucléotide ainsi choisi. Afin de vérifier leur spécificité, chaque oligonucléotide est comparé dans la base de données NCBI BLAST. L'ensemble des PCR mises en place utilisent la technologie Taqman, qui est classiquement utilisée dans la littérature pour la détection de micro-organismes. Pour les cibles IS*6110* et IS*1081* les sondes ont été marquées par le fluorochrome 6-Fam en 5' et couplées à la protéine MGB en 3'. Toutes les autres sondes ont été marquées par le fluorochrome 6-Fam en 5' et par le *quencher* BHQ1 en 3'. Le fluorochrome 6-Fam, émet la plus forte luminescence parmi les marqueurs et les « *quencher* » de type BHQ « *Black Hole Quencher* » et de type MGB « *Minor Growth Binding »* émettent très peu de bruit de fond (annexes 1-2-3).

b. Choix des cibles

Les cibles choisies sont les plus communément utilisées dans la littérature pour la détection de mycobactéries d'importance en santé publique vétérinaire (tableau 11).

Tableau 11 : Tableau des cibles utilisées

	Cibles	*M. bovis*	*M. bovis*^{BCG}	*M. microti*	Commentaire	Source du Design
Caractérisation du MTBC	IS*6110*	+	+	+	Les cibles IS*6110* et IS*1081* sont communes à tout le MTBC et permettent la mise en évidence du complexe. Largement utilisés dans le diagnostic de la TB, ces IS peuvent présenter plusieurs copies dans le génome.	(Hénault et al., 2006)
	IS*1081*	+	+	+		
	IS*1561*	+	+	-	Les cibles IS*1561* et RD4 permettent de réaliser une discrimination intra-MTBC et identifient distinctement *M. bovis* et *M. microti*	(Barbier, 2016) (Halse et al., 2011) ;
	RD4	-	-	+		
	RD1	+	-	-	RD1 (locus où se trouvent l'opéron pour ESAT6-CFP10) est absent ou partiel chez certains membres du MTBC peu pathogènes comme *M. microti* ou la souche vaccinale BCG	Ce mémoire
	RD1^{BCG}	-	+	-		
		M. nc*	**Maa***	**Mah***	**Commentaire**	**Source du Design**
Caractérisation des MNT	*hsp65*	+	+	+	Dans la littérature, le gène hsp65 est communément utilisé pour la mise en évidence des mycobactéries. Il s'agit du gène codant pour la protéine « *heat shock protein* 65 kDa », polymorphe dans le genre *Mycobacteriu*m et présent chez certains autres actinomycétales. Des SNPs spécifiques de *M. nonchromogenicum* sont identifiés dans ce gène.	Ce mémoire
	hsp65^{nc}	+	-	-		
	IS*1245*	-	+	+	La cible IS*1245* permet l'identification et la discrimination de *M. avium* subsp*. avium* et *M. avium* subsp *hominissuis*	

** M. nc: Mycobacterium nonchromogenicum ; Maa : M. avium* subsp *avium; Mah : M. avium* subsp *hominissuis*

c. Protocole expérimental

- Le « *master mix Fast Advanced* (Life Technologies) » et le « *master mix universal* » (Life technologies) ont été testés. L'adoption du réactif pour la validation de l'amplification par PCR s'est porté sur le « *master mix Fast Advanced* (Life technologies) » qui permet la réalisation de réaction PCR plus rapide (1h) et annule en grande partie les effets des inhibiteurs (annexe 4).
- Afin de standardiser les concentrations de chaque oligonucléotide, il a été conçu un mélange comprenant les 2 amorces et la sonde pour la détection de la cible le plus performant : plusieurs designs ont été réalisés pour chaque cible. Ainsi les mélanges sont testés à petite échelle sur leurs cibles respectives pour déterminer la meilleure combinaison. Le choix des combinaisons d'oligonucléotides est basé sur l'allure des courbes et sur leur spécificité vis-à-vis des espèces qu'elles doivent mettre en évidence (annexes 5-6-7).

La figure 21 représente le protocole mis en place.

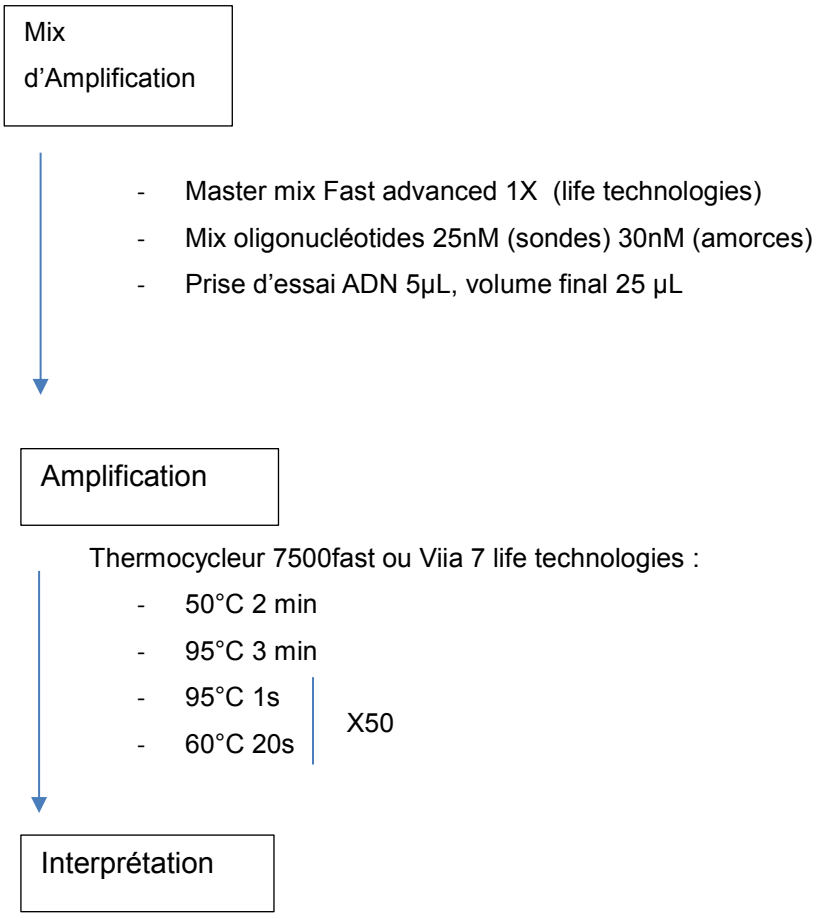


Figure 21 : Protocole de la PCR en temps réel

3. Mise en place du protocole de spoligotypage
    a. Protocole expérimental

La mise en place du protocole a nécessité la variation de l'ensemble de ces paramètres critiques afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible.

- Pour l'augmentation de la sensibilité de la PCR, la concentration d'amorces, la quantité de la Taq polymérase, la prise d'essai de l'échantillon et le programme PCR ont été des paramètres optimisés.
  La BSA (*Bovine Serum Albumine*), est connue pour être un excellent « absorbeur » de molécules qui serait susceptible d'inhiber la PCR et également, pour être un additif facilitant la dénaturation de l'ADN (Al-Soud and R\a adström, 2000). Cet additif a été rajouté dans le but d'éliminer l'action des inhibiteurs potentiellement présents dans les extraits d'ADN issu de tissus et d'augmenter la sensibilité de la PCR.

- L'optimisation de l'hybridation sur billes (2ème partie du protocole) repose sur l'augmentation de la sensibilité en concentrant le signal sur les billes. Pour tenir cet objectif, le volume d'amplicons prélevé, la quantité et le type de billes utilisées et ont été optimisés.

- Le mix de révélation et la révélation ont été optimisés via la concentration en SAPE, le temps d'incubation ainsi que par la méthode de récupération des billes après hybridation (centrifugation ou plaque magnétique).

Le protocole final et les conditions opératoires sont décrits dans la figure 22.

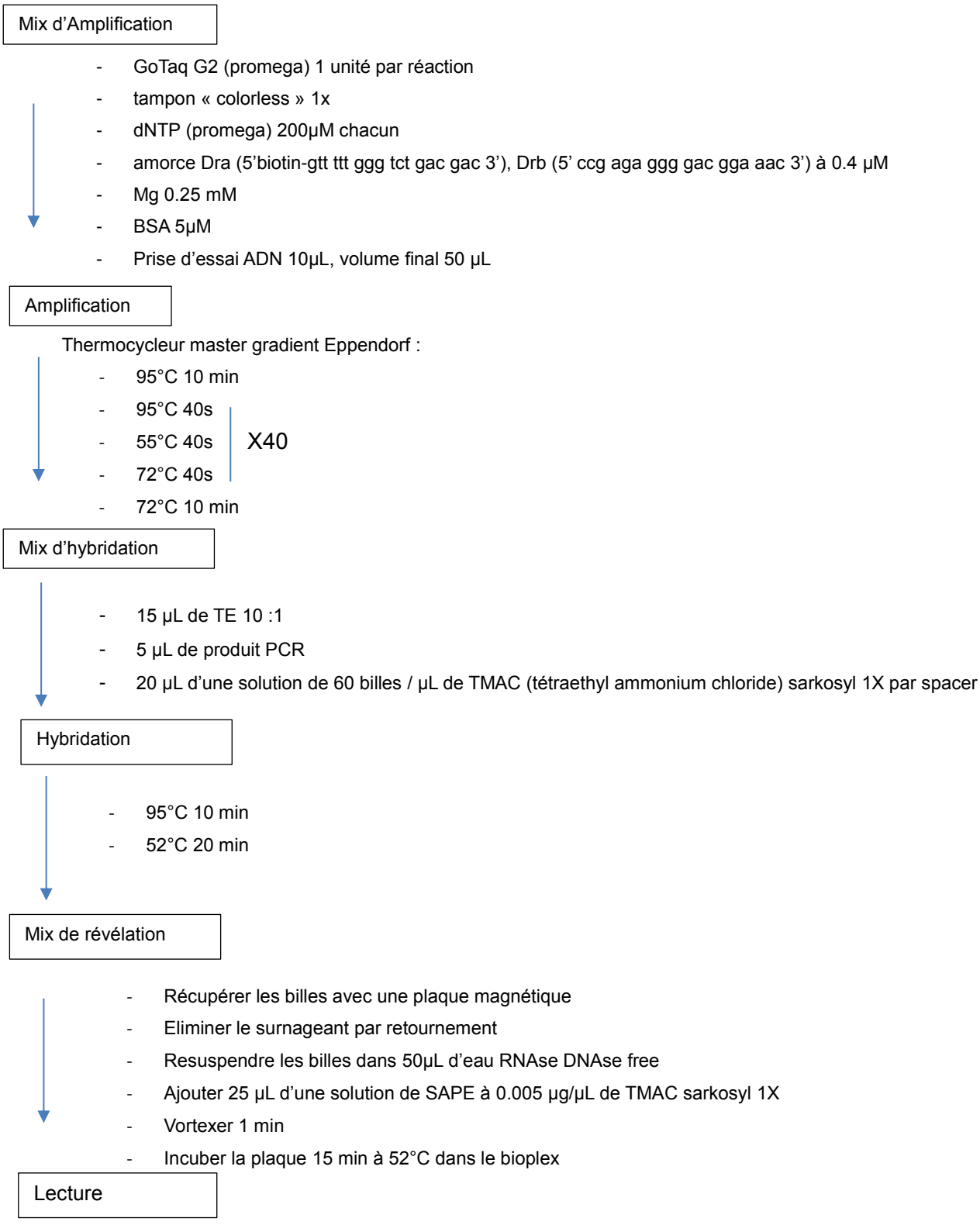


Figure 22 : Protocole expérimental du spoligotypage sur micro-arrays en phase liquide (technologie luminex)

II. Résultats et Discussion

1. Validation des PCR

La validation des PCR est réalisée en suivant la norme NF U 47 600 qui définit les exigences générales relatives au développement et à la caractérisation en vue de la validation d'un test PCR en santé animale. Elle permet de normaliser la caractérisation des méthodes selon plusieurs critères, notamment **la spécificité inclusive, exclusive et la détermination de la limite de détection (LD_{PCR}) à 95 %**. L'objectif étant de les utiliser en diagnostic ou en recherche et ainsi asseoir l'établissement d'un diagnostic par l'identification de la bactérie.

a. Notion de spécificité expérimentale inclusive (Sp inclusive)

Selon la norme, la spécificité (Sp) inclusive doit être testée sur un panel de souches bactériennes représentatif du genre étudié. Le LNR dispose d'un large panel de souches bien caractérisées appartenant au genre *Mycobacterium* dont 30 ont été choisies du fait de leur représentativité dans le diagnostic courant et dans la bibliographie vis-à-vis de leur importance vétérinaire. Ce panel a donc été utilisé avec les différents couples d'amorces ciblant différentes espèces de mycobactéries d'intérêt (tableau 12 et annexe 8).

b. Notion de spécificité expérimentale exclusive (Sp exclusive)

Selon la norme, la spécificité exclusive doit être réalisée sur un panel de micro-organismes proches génétiquement, capables d'infecter le même hôte ou analysés dans la structure où l'analyse est réalisée. Les oligonucléotides sont testés sur un panel de 46 extraits d'ADN de micro-organismes détenus au laboratoire (annexe 9).

c. Notion de limite de détection

La limite de détection à 95% (LD95) est la plus petite quantité de copies de cible détectée dans 95% des cas. Pour déterminer cette valeur, il a été réalisé une première gamme de dilution d'ADN de raison 10 qui permet de délimiter la « zone » en limite de détection de chaque PCR. La seconde étape consiste à réaliser une gamme de dilution de raison 2 entre les 2 derniers points positifs et le premier point négatif. Enfin 8 points ont été sélectionnés (6 positifs-2 négatifs) pour déterminer ce paramètre sur chaque couple d'amorces-sonde selon le protocole détaillé dans la norme : au moins 3 séances indépendantes, par un opérateur et sur 8 répliques de chaque dilution testée (annexe 10et 11). La valeur approchée de la LDPCR à 95 % est la concentration en cible qui correspond à la dilution donnant au minimum 23 résultats positifs sur 24 obtenus lors de l'amplification de 8 réplicats de chaque point de dilution sur 3 séances indépendantes.

Les ADN utilisés ont été extraits à partir d'une souche de *Mycobacterium bovis* de la forêt de Brotonne (monocopie en IS*6110* déterminé par RFLP au LNR), une souche de référence ANSES (10-226) de *M. avium* subsp *avium* monocopie en IS*1245,* d'une souche de référence ANSES (11-503) de *M. microti* et une souche de référence de *M. bovis BCG* Pasteur (CIP 105050) pour la cible RD1. La concentration de chaque solution d'ADN a été déterminée par spectrophotométrie et ce paramètre est rattaché à la sensibilité de la méthode (Se).

Tableau 12 : Choix des souches pour l'étude de la Sp inclusive

Espèce	Référence ANSES	Origine	Intérêt de sélection
M. flavescens	03-04743-00	bovin	Mycobactéries environnementales qui peuvent créer des lésions et utilisées dans le développement de méthodes PCR dans la littérature.
M. nonchromogeneicum	08-02671-00	bovin	
M. triviale	08-02769-00	bovin	
M. smegmatis	10-00949-00	bovin	
M. xenopi	10-00875-07	blaireau	
M. marinium	07-02488-00	Isolée d'un patient	
M. kansassi	08-01290-01	furet	
M. chelonae	09-01071-00	Isolée à partir d'eaux usées	
M. paraffinicum	09-01613-00	sanglier	
M. fortuitum	92-05399-09	bovin	
M. intermedium	10-00439-00	bovin	
M. terrae complex	09-00918-00	Souche de collection IRM77	
M. phlei	07-01124-00	Souche de collection Institut Pourquier interne	
M. gordonae	06-1266-00	Isolé au LVD31 (espèce non précisée)	
M. intracellulare	10-00203-00	porc	Mycobactéries d'intérêt en santé animale, avec un pouvoir pathogène.
M. avium hominissuis	09-01648-01	kangourou	
M. paratuberculosis	09-01068-00	caprin	
M. avium	10-00490-07	Isolée d'un eider à duvet	
M. bovis	11-01375	bovin	
M. BCG	11-01143	Institut pasteur CIP 105050	
M. microti	11-02400	chien	
M. africanum	78-06288-00	chimpanzé	
M. caprae	08-01438-00	bovin	
M. pinnipedi	94-04770-00	panthère	

d. Résultats de la validation

- Il est observé pour la LD95 une assez large variabilité de Se des systèmes de détection (tableau 13). La concordance entre la concentration d'ADN et le nombre de copies d'ADN cible a été réalisée pour une meilleure appréciation du niveau de la Se via la formule : [6.10^{23} x concentrations massique] / Poids moléculaire du génome.
- Dans le cas de la Sp inclusive, certains systèmes détectent l'ADN de quelques mycobactéries de façon non spécifique et très tardivement (ct > 33) (exemple : *M. nonchromogenicum* avec les cibles RD1 et IS*6110*, annexe 8*)*. Un seuil de positivité a donc été fixé à un Ct de 25 pour l'identification de souches. Ce type de réactions parasites non spécifiques est observable lorsque l'ADN est très concentré. Il est considéré que l'impact de ces réactions non spécifiques pour les analyses de routine sur des prélèvements est négligeable. En effet, la quantité d'ADN de bactéries à partir de prélèvements tissulaires infectés est largement inférieure à celle des souches pures utilisées pour l'étude de la Sp inclusive où on a pu observer des amplifications parasites.
- Dans le cas de la Sp exclusive, on observe des interférences sur la cible *hsp65* avec *Campylobacter sputorum biovar fecalis,* S*treptomyces spp* et *Rhodococcus equi* (annexe 9). Les mycobactéries sont très proches génétiquement du groupe des actinomycètes dont elles font par ailleurs partie. Le gène utilisé *hsp65* est présent chez certaines actinomycètes comme les *Rhodococcus spp* et sont détectés par le système PCR mis en place.

Le tableau 13 résume l'ensemble des données obtenues en étudiant le Sp inclusive, la Sp exclusive et la LD95 sur les différents couples d'amorces-sonde utilisés :

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des paramètres des PCR mises en place

Oligonucléotide	Séquence 5'→ 3'	Cible	LD95 (**copies/cupules**)	Spécificité inclusive	Spécificité exclusive
R Msp	ctc ctc gac ggt gat gac	*hsp65*	14	Sp +++	Sp +
F Msp	gcc aag gag gtc gag acc aa				
S Msp	acc ttg tcc atc gcc tcg gcg at				
F MSp	ctS aag cgc ggc atc ga	*hsp65*^{nc}	34	Sp+++	Sp+++
R Msp	ctc ctc gac ggt gat gac				
S Non	aag gtc acc tcg acc ctg ctg gct tc				
F 1245	gcc gcc gaa acg atc tac	IS*1245*	15	Sp++	Sp+++
R 1245	tga ccc ggt gcg cag ctt				
S 1245	tcg cgt ccg cgc acg ctg tcc a				
F RD1^{BCG}	tac gct cgc gtt cgt ggt	RD1^{BCG}	15	Sp+++	Sp+++
R RD1 ^{BCG}	gat gag tat tac cag gcc gac				
S RD1 ^{BCG}	tcc ggg cgg ctg ggt gat gtg c				
R RD1	cgg cgg caa ctg gcc aa	RD1 bovis	28	Sp+++	Sp+++
F RD1	agc cga tgg cgt cga tcc				
S RD1	tct tcg gaa tgc cct ccc ctg gca gc				
F IS6110	ggt agc aga cct cac cta tgt gt	IS*6110*	14	Sp++	Sp+++
R IS6110	agg cgt cgg tga caa agg				
S IS6110	cac gta ggc gaa ccc				
F IS1081	ccg cca ccg tga ttt cga	IS*1081*	3	Sp++	Sp+++
R IS1081	gcc agt ccg gga aat agc t				
S IS1081	ccg caa cca tcg acg tc				
F RD4	cca cga cta tga cta gga cag caa	RD4	6	Sp++	Sp+++
R RD4	aag aac tat caa tcg ggc aag atc				
S RD4	acc agt gag gaa acc				
F IS1561	gat cca ggc cga gag aat cgt	IS*1561*	6	Sp++	Sp+++
R IS1561	gga caa aag ctt cgc caa aa				
S IS1561	acg gcg ttg atc cga ttc cgc				

LD95 : plus petite quantité d'ADN détecté dans 95 % des cas selon le protocole de la norme NF-U-47-600, **Sp+ :** spécificité satisfaisante ; Sp++ : bonne spécificité ; Sp +++ : très bonne spécificité.

S xx : sonde de la cible xx, F xx : amorce « Forward » sens de la cible xx, R xx : amorce « Reverse » anti-sens de la cible xx, nc : *M. nonchromogenicum,* BCG : Bacille de Calmette et Guérin.

e. Conclusion

Chaque système de détection possède des caractéristiques propres, tant d'un point de vue de sensibilité que de spécificité. La LD95 de chaque méthode a été établie via un matériel génétique en (mono-copie si possible) pure extrait au phénol chloroforme. Cette technique d'extraction conserve l'intégrité de l'ADN et garantie la pureté de l'extrait. Les techniques utilisées pour l'extraction d'ADN des tissus en routine ne sont pas aussi performantes : les résultats obtenus ne sont pas tout à fait extrapolables pour une quantification sur ce type de matériel.

De plus, lorsque des échantillons de terrain sont analysés, il est difficile de maîtriser l'effet matrice lié au prélèvement. Par ailleurs, les cibles dans les séquences d'insertion sont caractérisées par la multiplication du nombre de copies présentes dans un génome qui peut varier au sein même de l'espèce. Ainsi les chiffres associés à la LD95 sont peu applicables sur des analyses de routine où l'objectif est qualitatif (présence ou absence d'un agent) et non quantitatif.
La spécificité de chaque système est acceptable compte tenu de l'étendue du genre *Mycobacterium.* L'amélioration de la spécificité est réalisée par l'utilisation en batterie de l'ensemble des systèmes et permet l'établissement d'un diagnostic fiable. Les amorces dessinées sur le gène *hsp65* détectent d'autres actinomycètes que les mycobactéries et permettent ainsi d'identifier d'autres agents, qui interfèrent dans le diagnostic de la TB en créant notamment des lésions dans l'examen d'histologie.

2. Validation de la méthode de spoligotypage par luminex

a. Analyse des résultats

L'appareil mesure la fluorescence émise par la bille couplée au *spacer* et la restitue sous format numérique. L'interprétation des résultats sur Luminex repose sur la détermination d'un seuil de positivité qui annule le bruit de fond et indique la présence ou l'absence d'un *spacer*.
Les données brutes sont analysées via une matrice qui regroupe les valeurs de fluorescence en fonction de leur valeur (figure 23). Grâce à ce mode de visualisation, le seuil pour chaque *spacer* est positionné entre la valeur la plus basse du bloc haut et la valeur la plus haute du bloc bas. Chaque série d'analyse doit être analysée de façon indépendante.

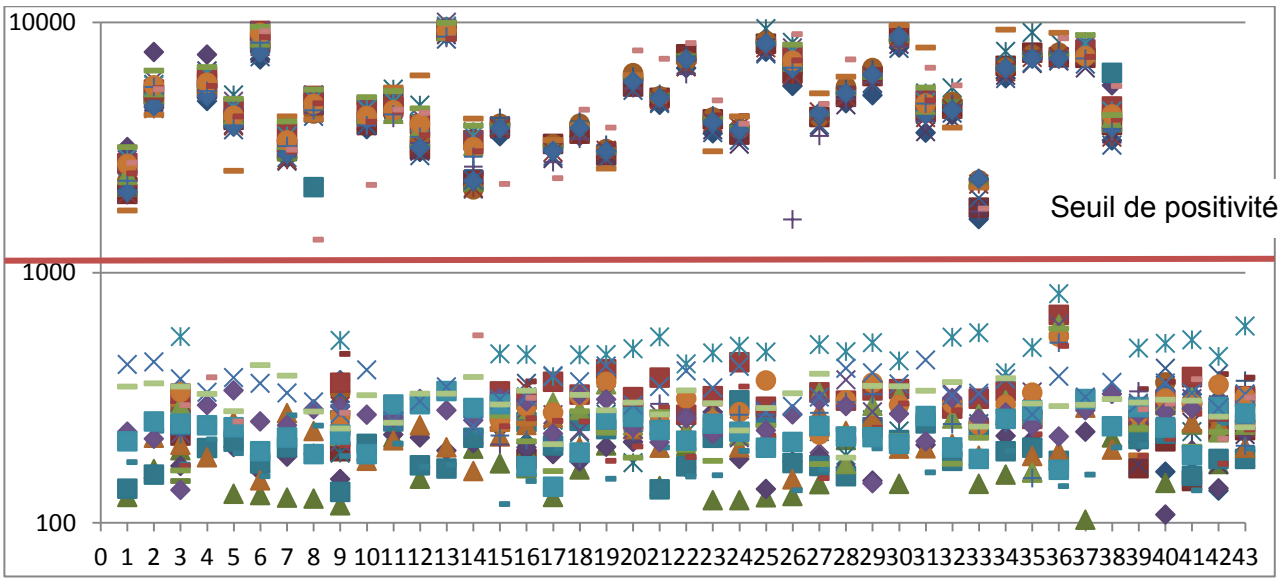


Figure 23 : Détermination du seuil de positivité sur les données brutes du Luminex
Les points représentent les valeurs de fluorescence pour chaque *spacer* et chaque échantillon

Le positionnement du seuil est critique pour l'interprétation des résultats sur des prélèvements faibles en concentration d'ADN cible. En effet, pour l'étude des lysats de souches le positionnement du seuil peut être généralisé aux 43 *spacers* (figure 24). En revanche pour l'analyse des extraits d'ADN issus de prélèvements, la concentration d'ADN étant très variable d'un échantillon à l'autre, il convient d'analyser les résultats de façon indépendante en se basant sur l'ensemble des données de l'échantillon pour déterminer la présence ou l'absence d'un *spacer*.

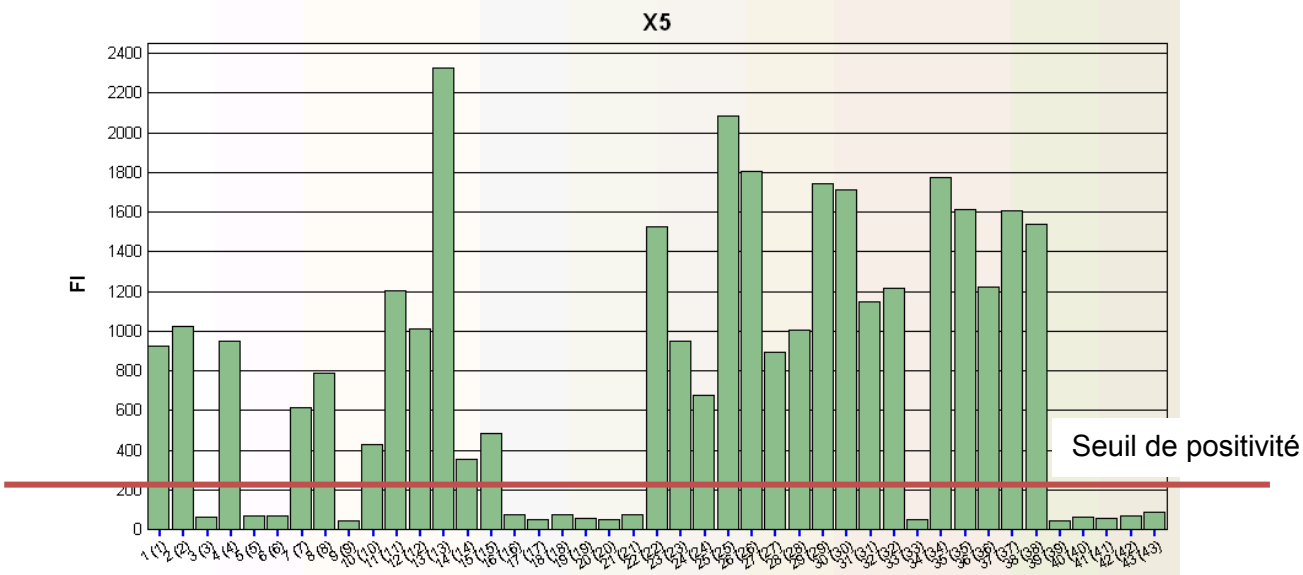
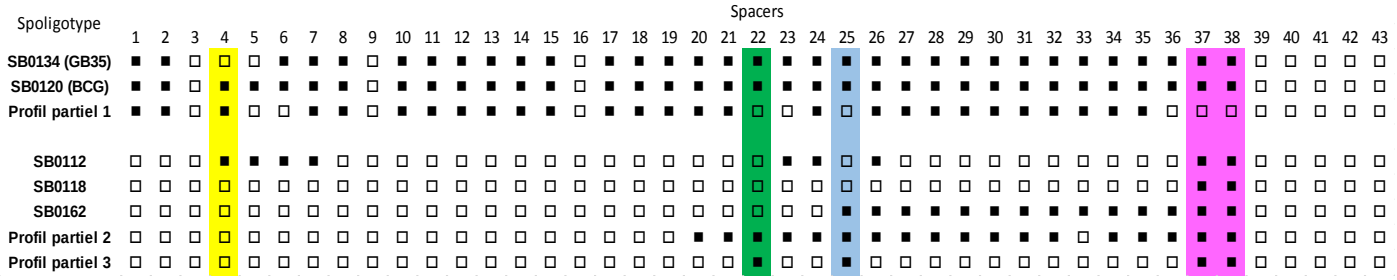


Figure 24 : Résultats de fluorescence brute d'une souche
Résultats brut de l'analyse des 43 *spacers* d'un lysat de souche de *M. bovis* de type SB0832. Ici le seuil de positivité est fixé à 200.

b. Interprétation du spoligotypage

Deux facteurs peuvent influencer la sensibilité de la méthode : l'efficacité de la PCR en amont et/ou la révélation par la SAPE. Dans les cas où la concentration en ADN de mycobactéries du MTBC est faible, notamment sur l'ADN extrait à partir d'organes, il est parfois obtenu un résultat de spoligotypage partiel. Cependant, ce type de résultats peut suffire pour déterminer l'espèce incriminée et donner des informations guidant le génotypage, notamment quand les génotypes régionaux sont très stables. Quelques exemples sont illustrés dans le tableau 14 :

Tableau 14 : Interprétation des résultats de spoligotypage



Jaune : *spacer* 4, vert : *spacer* 22, bleu : *spacer* 25, roses : *spacer* 37-38 ; Profils typiques de *M. bovis* : SB0120, SB0134 ; Profils typiques de *M. microti* : SB0112, SB0118, SB0162.

- **Le profil partiel 1** est orienté vers une identité de *M. bovis*, grâce à la présence de *spacers* présents chez cette espèce et absents chez *M. microti* et au profil SB0120 grâce à la présence du *spacer* 4 (jaune).
- **Le profil partiel 2** est orienté vers la mise en évidence de *M. bovis*, grâce à la présence des *spacers* 20 à 22, présents chez *M. bovis*, absent chez *M. microti*. En revanche, ces résultats ne permettent pas de définir un spoligotype.
- **Le profil partiel 3** est très peu informatif. Les *spacer* 37,38 (roses) et 25 (bleu) communs à *M. microti* et *M. bovis* sont présents. Seul le *spacer* 22 (vert) permet d'orienter le diagnostic vers la mise en évidence de *M. bovis*. Le faible niveau d'informations visualisables sur ce profil ne permet pas de conclure. La conclusion sera que le complexe *Mycobacterium tuberculosis* est mis en évidence sans pour autant pouvoir déterminer l'espèce.

3. Évaluation des performances des méthodes développées

a. Performances du spoligotypage

Pour évaluer la performance du spoligotypage, les résultats obtenus par cette méthode sont comparés avec ceux obtenus avec la PCR en temps réel selon 2 approches. La première approche compare le spoligotypage avec le système PCR déployé sur les laboratoires agréés du réseau Français. La seconde est basée sur une comparaison avec les systèmes mis en place au laboratoire et caractérisé par la norme.

- Dans le schéma diagnostique du réseau Sylvatub, les échantillons sont analysés par PCR en temps réel en première intention sur la cible génétique IS*6110* aux LVD. Puis, lorsque les PCR sont positives, ils sont analysés via le spoligotypage sur luminex au LNR. Entre 2015 et 2017 le LNR a analysé 440 échantillons d'ADN issus des prélèvements de la faune sauvage (pool de ganglions le plus souvent).

Le tableau 15 représente la répartition des 440 échantillons positifs à la PCR IS*6110* analysés et les catégorise selon leur valeur de Ct déterminée par la méthode PCR utilisé sur le réseau des laboratoires français.

Tableau 15 : Évaluation de la sensibilité du spoligotypage sur la faune sauvage.

Catégorie via la valeur des Ct (PCR de première intention IS*6110* LVD) (Nb de copies/puits)	**% d'échantillon (N)**	**% profils de spoligotypage (N)**
Ct ≤ 30 (>1000)	24 % (105)	100% (105) Profil complet
30 < Ct ≤ 35 (1000 < Qt < 10)	36% (159)	94% (149) Intra MTBC 1% (2) Juste MTBC 5% (8) Nég
35 < Ct ≤ 38 (10 < Qt < 1)	29% (126)	57% (72) Intra MTBC 5% (6) Juste MTBC 38% (48) Nég
Ct >38	11% (50)	22% (11) Intra MTBC 78% (39) Nég

Intra MTBC : possibilité d'identifier l'espèce au sein du MTBC ; juste MTBC : pas possible d'identifier l'espèce au sein du MTBC ; Nég : négatif

- **Cas des échantillons Ct ≤ 30** très concentrés : le profil spoligotype complet est déterminé dans 100% des cas.
- **Cas des échantillons 30 < Ct ≤ 35** moyennement concentrés : on détermine l'espèce dans 94% des cas avec un profil parfois partiel nous permettant malgré tout d'obtenir des informations épidémiologiques.
- **Cas des échantillons 35 < Ct ≤ 38** faiblement concentrés : Le profil obtenu est souvent partiel mais nous permet dans 57% des cas d'identifier l'espèce incriminée et parfois de récolter des données épidémiologiques.
- **Cas des échantillons Ct >38** dit douteux : il devient difficile d'identifier l'espèce, la spécificité du résultat est dans ces conditions discutable.

Cette étude met en avant la robustesse de l'analyse sur des échantillons reçus au laboratoire par le spoligotypage, vis-à-vis du système PCR appliqué par les 16 laboratoires du réseau. Il permet de la discrimination du MTBC dans 78% des cas sur la faune sauvage.

- Dans le schéma diagnostic suite aux analyses de première intention réalisée dans les LVD, les échantillons d'ADN issus des prélèvements de bovins ou de la faune sauvage positifs à la PCR MTBC, ou des prélèvements d'autres animaux domestiques sont envoyés au LNR et analysés par PCR en temps réel en premier lieu sur les cibles génétiques IS*6110* - IS*1081-IS1561-RD4*.

  Puis, lorsque les PCR sont positives, ils sont analysés via le spoligotypage avec le système Luminex. La comparaison des deux méthodes a été réalisée sur 343 échantillons positifs au LNR entre 2013 et 2016. Les tableaux 16 et 17 permettent de visualiser l'apport de ces deux méthodes conjointes.

Tableau 16 : Évaluation de la sensibilité du spoligotypage

	Négatifs (PCR LNR) (N)	Espèce déterminée dans le MTBC (N)	Espèce non déterminée dans le MTBC (N)	Total
Spoligotypage	24% (82)	68% (235)	8% (26)	343
PCR LNR	5% (19)	60% (205)	35% (119)	343

Le spoligotypage, permet d'identifier l'espèce au sein du MTBC dans 68 % des échantillons analysés contre 60% par PCR spécifiques (IS*1561* et RD4). Le spoligotypage affine le diagnostic puisqu'il permet d'identifier l'espèce dans 8% d'échantillons de plus par rapport aux PCR IS*1561* et RD4 qui sont moins sensibles (tableau 16).

Cependant lorsqu'il s'agit de mettre en évidence le complexe MTBC, la PCR est la méthode la plus sensible, puisqu'elle permet de mettre en évidence la présence du MTBC dans 95% de prélèvement positifs alors que le spoligotypage met en évidence que 76% d'échantillons appartenant au complexe (tableau 16).

b. Performances du système de détection et du typage utilisé au LNR

Le tableau 17 catégorise les 343 échantillons selon leur valeur de Ct déterminée par la méthode PCR des LVD (selon les méthodes précitées) de manière à visualiser les résultats obtenus en PCR LNR et en spoligotypage.

Tableau 17 : Catégorisation des performances du système de détection et de typage du LNR

Catégorie via la valeur des Ct (IS*6110* LVD) (Nb de copies/puits)	% d'échantillon (N)	% d'identification de l'espèce au sein du MTBC (par PCR LNR) (N)	% profils spoligotype	% d'identification de l'espèce au sein du MTBC (spoligotypage + PCR LNR) (N)
Ct ≤ 30 (>1000)	25 % (85)	100% (85) intra-MTBC	100% (85) Profil complet	100% (85)
30 < Ct ≤ 35 (1000 < Qt < 10)	43% (147)	64% (94) Intra MTBC 29% (43) juste MTBC 7% (10) dtx	78% (115) Intra MTBC 7% (11) juste MTBC 14% (21) Nég	85% (125) Intra MTBC 10% (15) juste MTBC 5% (7) dtx
35 < Ct ≤ 38 (10 < Qt < 1)	18% (63)	32% (20) Intra MTBC 43% (27) juste MTBC 25% (16) dtx	54% (34) Intra MTBC 3% (2) juste MTBC 43% (27) Nég	52% (33) Intra MTBC 32% (20) juste MTBC 16% (10) dtx
Ct >38	14% (50)	20% (10) Intra MTBC 8% (4) juste MTBC 32% (16) dtx 42% (21) Nég	22% (11) Intra MTBC 14% (7) Juste MTBC 66% (33) Nég	32% (16) Intra MTBC 12% (6) juste MTBC 20% (10) dtx 36% (18) Nég

Dtx : douteux ; intra MTBC : possibilité d'identifier l'espèce au sein du MTBC ; juste MTBC : pas possible d'identifier l'espèce au sein du MTBC ; Nég : négatif

- **Cas des échantillons Ct ≤ 30** très concentrés : le profil spoligotype est complet et l'identification de l'espèce est déterminée dans 100% des cas avec l'une ou l'autre méthode.
- **Cas des échantillons 30 < Ct ≤ 35** moyennement concentrés : Via les méthodes de spoligotypage et PCR on identifie l'espèce dans 78% et 64% respectivement, puis la mise en évidence du MTBC est effective dans 7% et 29% des cas.
  Lorsque les 2 méthodes sont utilisées en parallèle l'espèce est identifiée dans 85% des cas.
- **Cas des échantillons 35 < Ct ≤ 38** faiblement concentrés : on note les limites spécifiques de chaque méthodes avec une meilleure sensibilité pour la PCR et une meilleure discrimination pour le spoligotypage. En effet, le spoligotypage identifie l'espèce dans 54% des cas contre 32% pour la PCR qui met en évidence le MTBC dans 43 % des cas contre seulement 3% pour le spoligotypage. Les deux méthodes cumulées identifient l'espèce sur 52% des échantillons analysés
- **Cas des échantillons Ct >38** dit douteux : il devient difficile d'identifier l'espèce, la spécificité du résultat est dans ces conditions discutable. En effet, le profil obtenu est souvent partiel et nous permet d'identifier l'espèce dans seulement 22% des cas via le spoligotypage. Malgré tout, lorsque les 2 méthodes sont cumulées, l'espèce est identifiée dans 32% des cas. On note cependant que 36% des échantillons sont négatifs à cette concentration.

c. Conclusion

Le spoligotypage sur Luminex est moins sensible que la méthode par PCR en temps réel pour la confirmation d'un échantillon positif du MTBC de faible concentration. Néanmoins, la discrimination intra-complexe est meilleure. Il permet ainsi l'obtention des informations nécessaires à la gestion de suspicions de tuberculose bovine, en écartant par exemple des infections à *M. microti.* Cette dernière ne fait pas partie des agents pathogènes responsables de tuberculose bovine et n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Bien que le résultat obtenu soit parfois partiel, cette méthode permet l'observation de certains critères spécifiques, utilisables notamment dans le suivi épidémiologique en ce qui concerne les génotypes.

L'association des méthodes de PCR en temps réel et de spoligotypage sur luminex pour la mise en évidence et la discrimination du MTBC, augmente l'efficacité du diagnostic en donnant la possibilité de conclure sur le statut infectieux ou pas d'un échantillon dans 95% des cas. Le spoligotypage utilisé en deuxième intention directement au LNR, permet d'identifier l'espèce mycobactérienne associée à la collecte de données épidémiologiques et accélère de façon considérable (environ 4 mois de moins) la chaîne de diagnostic.

Chapitre 4 : Applications des méthodes mises en place pour la discrimination du MTBC

I. Mise en évidence de la circulation de la souche vaccinale dans les tissus de blaireaux pour une mise en place d'un vaccin oral chez le blaireau en Europe

1. Contexte

La faune sauvage aux alentours des cheptels joue un rôle majeur dans la persistance de la TB lors d'infections retours aux bovins et favorise la circulation de *M. bovis* dans l'environnement.
Les stratégies de lutte contre la TB visant à l'éradication de la maladie sont implémentées dans les grands réservoirs, le bétail et la faune sauvage. En France, en Irlande et au Royaume-Uni, les blaireaux font l'objet d'études visant à évaluer leur statut épidémiologique et leur rôle dans le maintien de la TB au sein de la faune sauvage. En Irlande et au Royaume-Uni, ils ont été identifiés comme étant le réservoir de la TB et ont à ce titre un rôle majeur. En France, leur statut est encore à déterminer bien que dans les régions où circule *M. bovis* les blaireaux positifs aient été détectés. Des vaccins oraux ont été développés avec succès pour la faune sauvage (Kaden et al., 2006 ; Lei et al., 2010) et incitent les investigation en ce sens pour les blaireaux.
C'est dans le cadre d'une collaboration avec le Royaume-Uni que pour la première fois il a été étudié la mise en place de vaccins oraux pour les blaireaux en Angleterre via une souche vivante du bacille atténué, le bacille de Calmette et Guérin (BCG). L'administration du vaccin aux blaireaux est réalisée selon 4 protocoles, les animaux sont ensuite abattus, puis les tissus autours de la tête, thoraciques et abdominaux sont analysés par bactériologie et PCR. L'objectif est d'étudier la circulation de la souche vaccinale dans les tissus.

2. Matériel et méthode

Au total, 20 blaireaux ont été piégés dans une zone indemne de TB près de Nancy (8 en 2009 et 12 en 2014). L'étude a été autorisée par le comité d'éthique de l'Anses / ENVA / UPEC (C 54-431-1) et par le comité d'éthique de l'APHA (*Animal and Plants Health Agency*). Les blaireaux ont été répartis dans 4 enclos différents et identifiés à l'aide d'une puce. Après une période d'adaptation, les blaireaux ont été vaccinés en utilisant une capsule ou manuellement, avec des doses et/ou des additifs distincts :

- Insertion d'une capsule étanche contenant 200µL de vaccin directement dans l'estomac.
- Vaccination manuelle de 50 µl de suspension bactérienne sur chaque amygdale et sous la langue.
- Vaccination manuelle de 50 µl de suspension bactérienne sur chaque amygdale et sous la langue puis ajout par la suite d'huile d'arachide hydrogénée ou de beurre de cacao.

Huit semaines après la vaccination, les animaux ont été euthanasiés et 20 tissus ont été prélevés répartis sur 3 parties de l'animal :

- autour de la tête, 9 tissus sont ciblés : la paire d'amygdales, de ganglions rétropharyngiens et mandibulaire, la glande parotide, l'œsophage et un lavage trachéo-bronchique
- les ganglions thoraciques
- au niveau des tissus abdominaux 10 prélèvements sont analysés : les muqueuses gastriques, le duodénum, le jéjunum, l'iléum, le colon, le rectum, les ganglions mésentériques et hépatiques, la rate et le foie.

Les prélèvements ont été mis en culture et l'ADN a été extrait avec le kit « High Pure Template Preparation » (Roche) en appliquant les protocoles décrits. Les extraits d'ADN ont ensuite été analysés par les méthodes PCR avec l'étude des cibles validées *hsp65*, IS*6110*, IS*1081*, IS*1245*, RD1 et $RD1^{BCG}$. L'objectif est de détecter les mycobactéries d'intérêt du MTBC, du MAC et de mettre en évidence la présence de la souche vaccinale dans les tissus ciblés. Dans les extraits d'ADN il est également rajouté un IPC afin de mettre en évidence les inhibitions éventuelles dues aux différentes matrices extraites.

3. Résultats

La souche vaccinale a pu être identifiée chez tous les blaireaux par PCR sur prélèvement sur au moins 1 des 20 tissus prélevés alors que la souche a pu être isolée uniquement sur 16 animaux. La PCR a donc confirmé que tous les blaireaux ont bien absorbé le vaccin quel que soit le protocole utilisé ; les capsules sont retrouvées ouvertes lors de leur évacuation par l'animal confirmant la libération du vaccin.

La PCR sur prélèvements met en évidence la souche vaccinale sur 30 (7.5%) prélèvements de plus que la bactériologie, notamment dans les tissus abdominaux (tableau 18) et a relevé la présence de MNT comme *Mycobacterium avium spp,* également dans les prélèvements des tissus abdominaux. De plus, certaines analyses bactériologiques de tissus abdominaux trop contaminés, étaient inexploitables.

La survie du BCG et des MNT dans les tissus abdominaux n'est pas optimale. Le système immunitaire des animaux combinés aux facteurs environnementaux de l'intestin (flore bactérienne, effet de dilution, pH…) détruit la souche vaccinale et diminue son pouvoir protecteur.

Tableau 18 : Détection de la souche vaccinale sur les prélèvements analysés par bactériologie et par PCR

	Prélèvements			**Nombre total de tissus analysés**
	Tissus prélevés autour de la tête	Tissus thoraciques	Tissus abdominaux	
Par bactériologie	12% (47)	0.25% (1)	2.75% (11)	400
Par PCR sur prélèvement	12 % (49)	1% (4)	9% (36)	400

4. Conclusion

La mise en place et la validation des méthodes PCR a permis d'évaluer de façon précise les résultats des tests préliminaires dans le cadre de l'élaboration d'un vaccin oral via la souche vaccinale (BCG) chez les blaireaux. Les résultats suggèrent fortement aux chercheurs que la porte d'entrée principale du BCG est la région oro-pharyngée et pourrait être activement visée pour l'administration d'un vaccin. En effet, la PCR ciblée sur RD1 amplifiée sur deux zones distinctes du locus a permis d'identifier la souche vaccinale en écartant la contamination potentielle des blaireaux par une souche *M. bovis* virulente. Par ailleurs, la PCR a permis de mettre en évidence la présence du BCG dans 7.5 % de tissus en plus par rapport à la bactériologie, démontrant son intérêt pour l'exploitation rapide et efficace des résultats dans le cadre de protocoles d'expérimentations animales de cette envergure. La variabilité des matrices dont l'ADN a été extrait, interfère peu dans la mise en évidence des mycobactéries dans cette étude ce qui met en lumière la robustesse des PCR vis-à-vis d'inhibitions potentielles.

II. Mise en évidence de *M. bovis* dans l'environnement

1. Contexte

La Côte d'Or est une région où la tuberculose bovine est endémique (figure 26). La maladie circule aussi bien chez les bovins que dans la faune sauvage alentours (Payne, 2014) avec un spoligotype dominant (SB0120). Historiquement, la voie de contamination directe entre bovins est privilégiée. Cependant, la contamination via l'environnement est fortement suspectée dans les foyers de tuberculose bovine lorsque la faune sauvage et les bovins partagent les mêmes ressources. Cette hypothèse n'a cependant jamais été explorée en France.
C'est dans le cadre d'une étude en Côte d'Or que, pour la première fois, on recherche la présence de l'agent pathogène dans l'environnement dans 15 zones à proximité de cheptels infectés. Les échantillons sont analysés par PCR à l'INRA en 1ère intention puis par le LNR en 2nd intention via le spoligotypage.

2. Matériel et méthodes

Les prélèvements sont effectués dans l'eau, le sol, les terriers et les latrines de blaireaux à proximité des pâtures de bovins dans 15 zones où des foyers de tuberculose sont déclarés (figure 25).
L'étude est basée sur l'extraction d'ADN des 356 prélèvements effectués puis sur la détection de *M. bovis* par PCR en temps réel et par spoligotypage utilisant la technique Luminex.
L'INRA (Institut Nationale de Recherche Agro-alimentaire) de Dijon a mis en place une PCR qui cible l'IS*1561* (différente de celle développée dans ce mémoire) (Barbier, 2016), séquence d'insertion présente chez *M. bovis* et absente chez *M. microti*. Les échantillons détectés positifs ont été acheminés au LNR pour analyse via le spoligotypage.

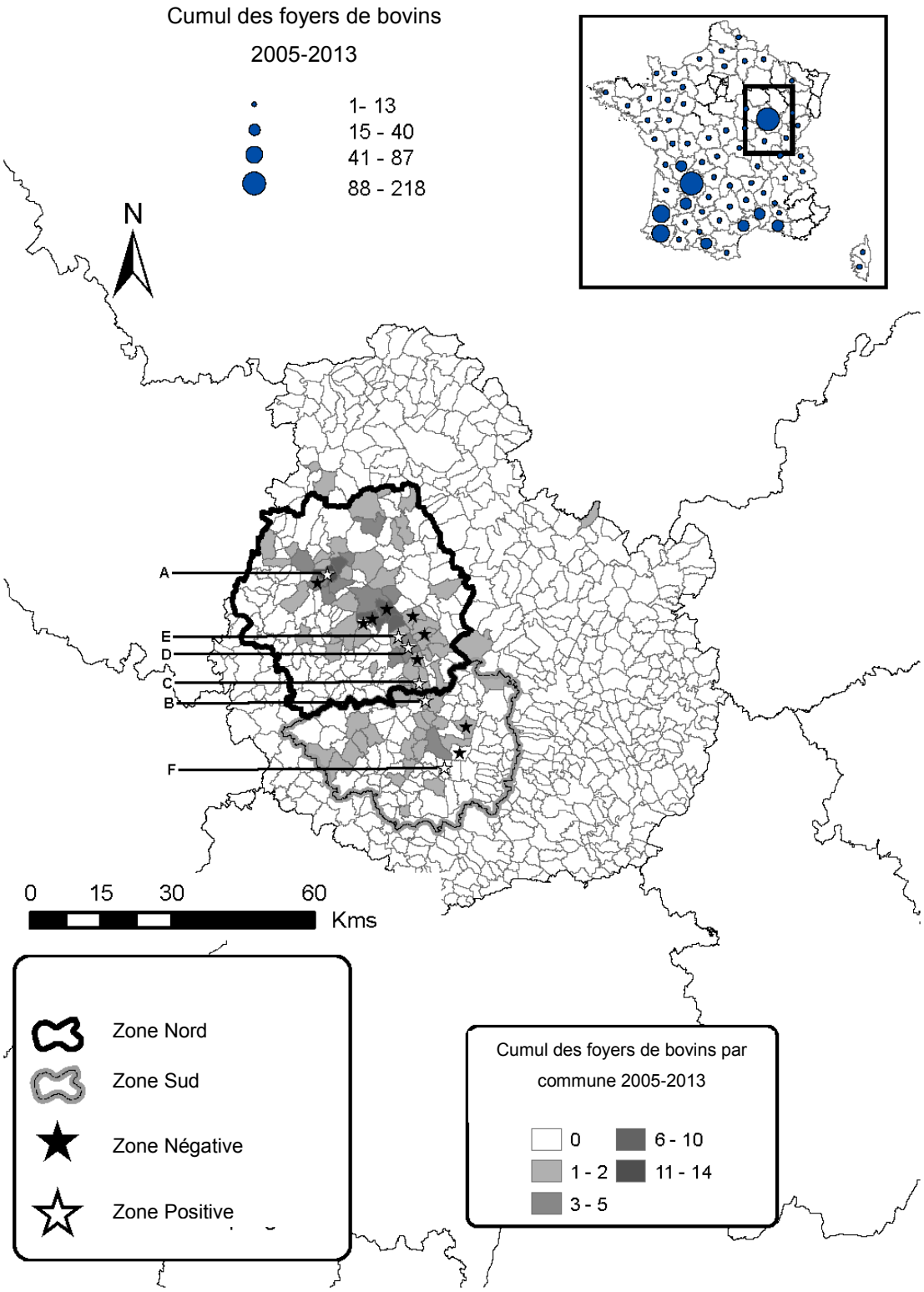


Figure 25: Distribution des foyers cumulatifs de TB chez les bovins en France (image dans l'insert ci-dessus) et par commune en Côte d'Or de 2005 à 2013.
Les localisations géographiques des zones échantillonnées sont indiquées par des étoiles noires et l'emplacement des six domaines positifs sont indiqués par des étoiles blanches et nommés A, B, C, D, E et F, respectivement (Barbier, 2016).

3. Résultats

Parmi les 356 échantillons analysés, cinq ont été identifiés positifs par PCR IS*1561* à l'INRA. Le profil spoligotype (partiel ou complet) retrouvé dans 4 des 5 échantillons, correspond à celui de *Mycobacterium bovis* SB0120 dominant dans la région. Un échantillon d'eau a présenté un profil très partiel. Néanmoins, certains *spacers* détectés dans l'échantillon (comme le 11 et le 26) (figure 26) ne sont pas présents chez l'autre MTBC environnementale, *M. microti*. Ces résultats ont été les premiers en France démontrant la présence de l'ADN de la bactérie responsable de tuberculose bovine dans un échantillon provenant d'un terrier de blaireau (figure 26).

Zone	Type de prélèvement	Date de prélèvement	Profil Spoligotype	Interprétation
D	Sol de terrier de blaireaux 2	Mars 2014	■■□■■■■■□■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□	*M. bovis* SB0120
D	Sol de terrier de blaireaux 1	Mars 2014	■■□■■■■■□■■■■■■□□■■■□□□■■■■■■■■■■■■■■□□□□□	*M. bovis* Profil partiel
D	Sol de terrier de blaireaux 3	Mars 2014	■■□■■■■■□■■■■■■□□■■■□□□■■■■■■■■■■■■■■□□□□□	*M. bovis* Profil partiel
D	Sol de terrier de blaireaux 5	Novembre 2014	■■□■■■□□□□■■■□□□□■■■■■■■■■□■■■■■■■■■□□□□□	*M. bovis* Profil partiel
C	Eau	Février 2014	□□□□□□□□□□■□□□□□□□□□□□□□□□■□□□□□□□■■■■□□□□□□	MTBC Profil partiel

Figure 26 : Résultats du spoligotypage d'échantillons d'ADN extraits de matrices environnementales (E. Barbier et al., 2016)

4. Conclusion

L'optimisation du spoligotypage dans le cadre de cette étude a permis de mettre en évidence la présence du spoligotype SB0120 de *M. bovis* dans l'environnement pour la première fois en France. Cette étude appuie l'hypothèse selon laquelle la voie de contamination par l'environnement serait un facteur non négligeable dans la persistance de la maladie.

III. Mise en évidence des infections animales à *Mycobacterium microti*

1. Contexte

M. microti est une mycobactérie appartenant au complexe *tuberculosis*, responsable de la tuberculose chez les petits rongeurs. Elle est capable d'infecter d'autres espèces, notamment dans la faune sauvage et domestique mais également l'homme. Étant donné la grande similitude avec les autres membres du MTBC identifiés comme étant des agents de tuberculose bovine, elle pourrait interférer dans les tests *ante-mortem* de première intention dans le diagnostic de la TB mais également avec les tests directs. En effet, elle provoque des lésions tuberculeuses identiques à celles de *M. bovis* à l'histologie et des réactions positives aux PCR de première intention utilisées sur le terrain. Ainsi, une infection à *M. microti* peut interférer avec le diagnostic de la tuberculose bovine et bloquer les activités d'un cheptel.

La prévalence de *M. microti* est mal connue. Elle est plus difficilement cultivable que *M. bovis* et souvent elle ne peut être identifiée que par des méthodes de biologie moléculaire directement sur les prélèvements pathologiques. Pour la première fois en France, il a été réalisé une étude rétrospective sur 35 cas d'infection à *M. microti* pour étudier la diversité des profils génétiques visualisés par le spoligotypage et leurs répartitions géographiques.

2. Matériel et méthodes

- Sur la base d'une étude rétrospective, 35 cas de tuberculose dus à *M. microti* chez les chats, les chiens, des sangliers et autres espèces, sur une période allant de 2002 à 2014 sont analysés par le biais du spoligotypage. Un arbre phylogénétique des différents profils spoligotypes a été réalisé avec le logiciel Bionumerics (figure 27-28).
- La proportion de *M. bovis* et de *M. microti* a été étudiée sur 664 ADN (positifs aux niveaux des LVD et transmis au LNR) issus de prélèvements de la faune sauvage obtenus via le réseau Sylvatub, sur une période allant de 2015 à 2017 et analysé par spoligotypage et PCR.

3. Résultats et discussion

❖ Les 35 cas de tuberculose dus à *M. microti* chez différents hôtes sont répartis en 4 groupes : A, B, C et D (figure 27 et 28).

- Le groupe A composé uniquement du spoligotype SB0118 est présent sur l'ensemble de la France, principalement chez des chats, dans la faune sauvage et des lamas.
- Le groupe B composé des spoligotypes SB0162, SB2275, SB2276 et SB2274 est principalement retrouvé dans le nord de la Bretagne notamment chez le chat
- Le groupe C est composé par le spoligotype SB2273 et de ces dérivés. Il est retrouvé dans le centre de la France essentiellement dans la faune sauvage.
- Le groupe D est composé des spoligotypes SB0112 et SB0423, localisé dans le Sud de la France, plutôt au sein de la faune domestique.

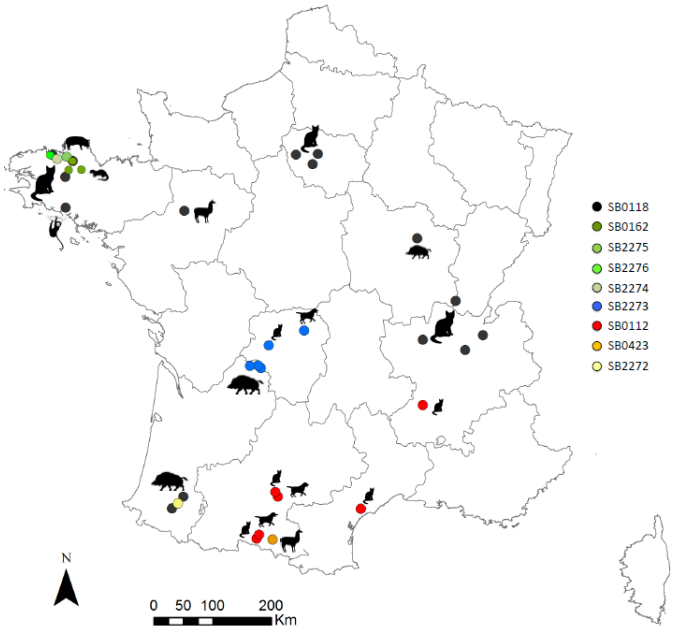


Figure 27 : Localisation des profils spoligotypes de *M. microti* (Michelet et al., 2015b)

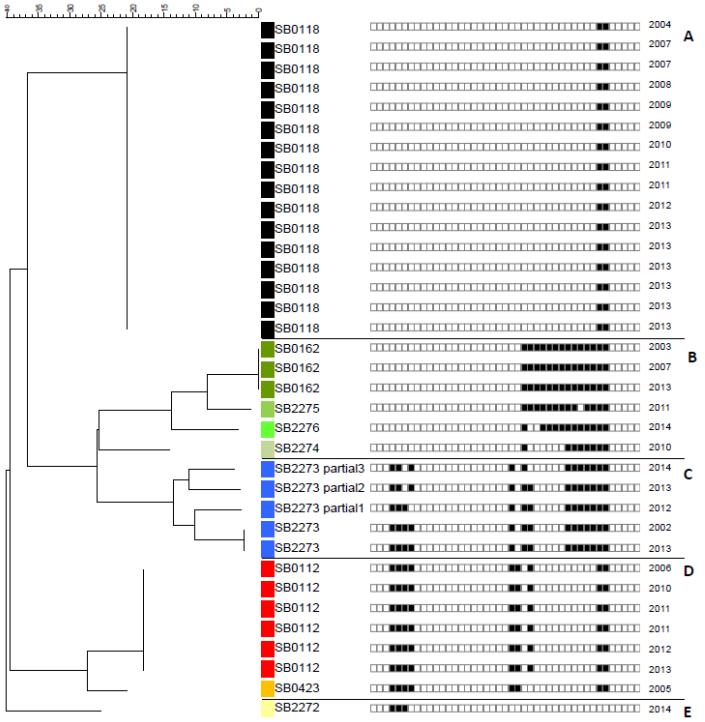


Figure 28 : Arbre phylogénétique des spoligotypes de *M. microti* (Michelet et al., 2015b)

- Parmi les 664 échantillons analysés, les résultats mettent en évidence la présence de *M. microti* dans la faune sauvage dans 12% des cas et dans 78% des cas, une infection par *M. bovis* est confirmée. Enfin, dans 10% des cas, le système n'est pas suffisamment discriminant pour l'identification de l'espèce (tableau 19).

Tableau 19 : Proportion de *M. microti* dans la faune sauvage

Espèces	*M. bovis*	*M. microti*	MTBC	Total
Identification par PCR/Spoligotypage	78% (514)	12% (81)	10% (69)	664

4. Conclusion

Le spoligotypage sur prélèvement a permis de réaliser une étude montrant la diversité génétique de *M. microti* pour la 1ère fois en France. Quatre groupes clairement régionalisés ont été mis en évidence sur le territoire. L'étude suggère également que la prévalence de la bactérie est largement sous-estimée (de par ses caractéristiques culturales complexes) et par conséquent, son impact sur le diagnostic de la TB. L'utilisation du spoligotypage en 2de intention sur prélèvement permet une orientation plus rapide et fiable vers l'identification de l'espèce. Au sein de la faune sauvage, le spoligotypage et le système PCR sont largement utilisés pour mettre en évidence *M. microti*.

Chapitre 5 : Applications des méthodes mises en place pour la discrimination des MNT

I. Le cas des échantillons Histologie +/ PCR –

1. Contexte

Le dépistage de la TB repose en partie sur la détection, lors de l'inspection à l'abattoir, de lésions évocatrices de tuberculose, qui sont prélevées et envoyées à un laboratoire agréé pour le diagnostic par bactériologie, PCR et histopathologie (figure 29) (méthodes officielles selon la Directive UE 64-432). Cette dernière méthode est basée sur l'analyse macroscopique de tissus par la coloration à l'hématoxyline-éosine afin de mettre en évidence les lésions dites « évocatrices de tuberculose ». Elle est plus sensible que la PCR mais moins spécifique d'une infection due à *M. bovis*. D'autres bactéries comme les MNT et les actinomycètes (notamment *Rhodococcus equi*) sont capables de générer des lésions semblables. Les actinomycètes possèdent un génome très proche de celui des mycobactéries (Gao and Gupta, 2012), partagent certains gènes (comme le gène *hsp65*) et les mêmes niches écologiques (Savini et al., 2012). Les lésions causées par *R. equi*, sont difficiles à distinguer de celles causées par *M. bovis*.

À ce jour, le test d'histopathologie est le seul test rapide post mortem officiellement reconnu par la Commission Européenne, permettant d'orienter le schéma diagnostic de la tuberculose bovine. Le manque de spécificité de l'histopathologie, génère cependant la mise sous APMS de cheptels qui au final se révèlent ne pas être infectés et donne lieu à de fortes pertes économiques pour les éleveurs en raison du blocage imposé. La diversité des micro-organismes provoquant des lésions a été étudiée sur la base des données du LNR dans le cadre de leur expertise lors de résultats discordants : un résultat négatif en PCR de 1ère intention aux LVD et un résultat positif à l'histologie (figure 29). L'analyse de 170 prélèvements par séquençage du gène *hsp65* de bactéries autres qu'appartenant au MTBC ou au MAC a été réalisé.

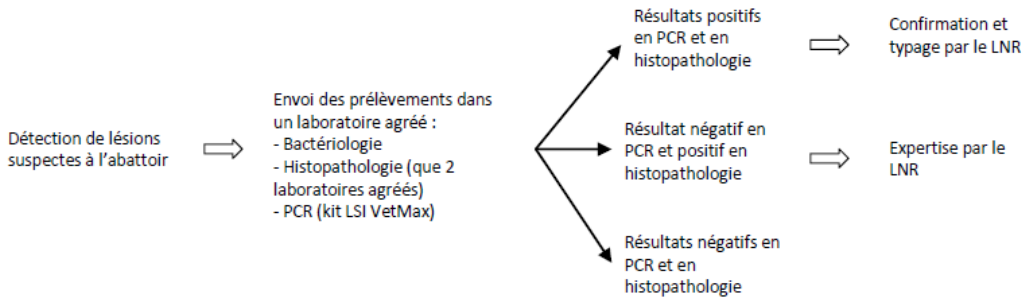


Figure 29 : Schéma diagnostic de la tuberculose bovine à la suite de la découverte de lésions à l'abattoir (Michelet et al., 2016a)

2. Matériel et méthode

L'étude est basée sur l'analyse des bactéries qui interfèrent dans le diagnostic de la TB sur 170 prélèvements de bovins (2013-2015) issus de l'analyse des laboratoires du réseau selon le protocole du Kit LSI VetMAX *Mycobacterium tuberculosis* Complex Real-Time PCR, discordants. Les broyats sont analysés en 2de intention au LNR en suivant le protocole kit « Roche High Pure Preparation template » puis analysés par les systèmes PCR mis en place (IS*6110*, IS*1081*, IS*1245*, *hsp*65). En 3ème intention, l'identification des mycobactéries non tuberculeuses ou autres actinomycètes (*hsp65* +) est réalisée par le séquençage du gène *hsp65* (McNabb et al., 2004). Les séquences obtenues sont ensuite comparées aux bases de données GenBank/EMBL/DDBJ avec le programme BLAST.

3. Résultats

Grâce à cette étude il est identifié 22% (36) de mycobactéries non tuberculeuses, 57% (99) d'actinomycètes et 21% (40) de prélèvements négatifs. *M. avium* spp et *M. nonchromogenicum* ont été recensées dans 42% (15) et 5 % (2), des cas de lésions dues à des MNT alors que *R. equi* a été identifié dans 93% des cas où des lésions causées par des actinomycètes ont été observés (tableau 20). Toutes les mises en cultures sont négatives pour la tuberculose bovine après les 3 mois réglementaires.

Sur l'ensemble des 170 échantillons analysés *R. equi* est identifiée dans 54% des cas où l'histologie est positive

Tableau 20: Bactéries identifiées par séquençage (Michelet et al., 2016a)

Groupe	Espèces	N
Mycobactéries non tuberculeuses	*M. avium avium*	12
	M. avium hominissuis	3
	M. avium paratuberculosis	4
	M. aichiense	1
	M. bourgelatii	1
	M. gordonae	1
	M. intracellulare	1
	M. kansasii	2
	M. nonchromogenicum	2
	M. pyrenivorans	1
	M. shimoidei	1
	Mycobacterium sp	7
Actinomycétales	*Gordonia* sp	1
	Nocardia sp	4
	Rhodococcus erythropolis	2
	Rhodococcus equi	92
Total		**135***

*Cinq échantillons étaient co-infectés.

4. Conclusion

La mise en évidence de l'actinomycète *R equi* largement présente dans l'environnement, confirme qu'elle interfère dans l'examen macroscopique et est capable de générer des lésions similaires à celles de la tuberculose bovine.

L'utilisation de la PCR en première intention sur prélèvement suivi de notre système d'identification moléculaire permet de simplifier, d'accélérer le processus du diagnostic de la TB et de lever rapidement les suspicions générées à la suite de la déclaration de lésions évocatrices de TB provoquées par d'autres mycobactéries ou d'autres actinomycétales. L'analyse des prélèvements par la PCR (aussi rapide et plus spécifique que l'histopathologie) pourrait intégrer à l'échelle européenne le schéma diagnostic de la tuberculose bovine et raccourcir de manière considérable la chaîne de diagnostic (4 mois de moins). Cette étude confirme le manque de spécificité de l'examen d'histopathologie, pourtant au cœur du schéma décisionnel de la lutte contre la TB.

II. Caractérisation des souches de mycobactéries non tuberculeuses qui peuvent générer des résultats non spécifiques aux tests ante-mortem

1. Contexte

L'interférence causée par des mycobactéries non tuberculeuses avec la surveillance de la TB est une préoccupation importante, surtout dans un pays à faible prévalence comme la France. En effet, le manque de spécificité du système de diagnostic entraîne un déclin général de la confiance des acteurs sur le terrain d'une part et une sous-déclaration de TB d'autre part. Par conséquent, une transmission lente et insidieuse de TB peut avoir lieu, ce qui, dans une certaine mesure, pourrait expliquer les récents chiffres de prévalence croissante. Afin d'évaluer quels agents mycobactériens pourraient induire des interférences diagnostiques en ce qui concerne le TB en France, il a été :

- analysé l'identité des souches MNT isolées des bovins durant la période 2009-2013
- étudié la répartition géographique des deux MNT les plus abondantes *M. nonchromogenicum* et *M. avium spp,* durant la période 2012-2016 chez les bovins
- étudié la proportion des 2 principales MNT au sein de la faune domestique et sauvage durant la période 2013-2015
- étudié l'impact de la forte proportion de *M. nonchromogenicum* et *M. avium spp* sur les tests de 1ère intention ante-mortem durant la période 2013-2016 dans une zone endémique.

2. Analyse de l'identité des MNT qui interfèrent dans le diagnostic de la TB

a. Matériel et méthodes

Il a été étudié 1.588 souches de mycobactéries (*M. bovis* et MNT), isolées des bovins, de 2009 à 2013. Les animaux étudiés ont réagi positivement aux tests ante-mortem ou ont présenté des lésions à l'abattoir. L'isolement des souches a été effectué par la méthode de référence bactériologique française (décontamination par H_2SO_4). L'identification des souches a été réalisée via les systèmes PCR en temps réel mis en place dans ce mémoire et par l'analyse de la séquence du gène *hsp*65 pour les autres MNT. Le diagnostic différentiel est représenté dans le tableau 21.

Tableau 21 : Tableau de diagnostic différentiel

	hsp65	***hsp*65^{nc}**	**IS1245**	**IS6110**	**IS1081**	**IS1561**	**RD4**	**Séquençage**
M. bovis	+	-	-	+	+	+	-	
M. nc*	+	+	-	-	-	-	-	
***M. avium* spp**	+	-	+	-	-	-	-	
***Mycobacterium* spp**	+	-	-	-	-	-	-	x

(+) résultats positif à la PCR, (-) résultats négatifs à la PCR, (x) réalisation du séquençage pour les *M. spp* autres que *M. bovis*, *M. nonchromogenicum* et *M. avium*

M. nc : Mycobacterium nonchromogenicum*

b. Résultats

i. Évolution de l'identification des souches de mycobactéries lors du diagnostic de la tuberculose bovine

Sur les souches de mycobactéries isolées entre 2009 et 2013, 1087 souches ont été identifiées comme *M. bovis* et 501 comme MNT. Avec l'intensification de la surveillance de la TB, il est observé que le nombre de souches de *M. bovis* a doublé entre 2009 et 2013, mais celui des MNT a quant à lui été multiplié par 10 (figure 30).

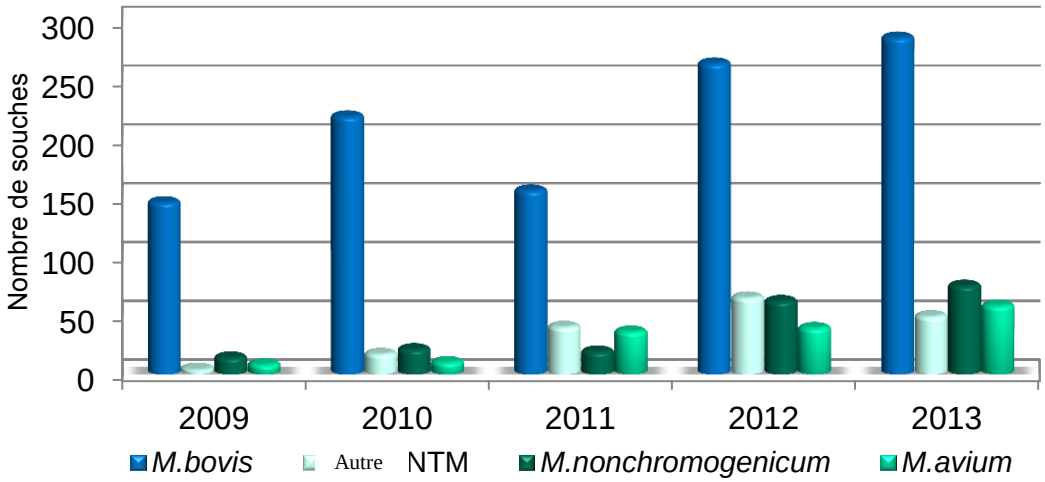


Figure 30 : Répartition des MNT dans le diagnostic de la tuberculose bovine

La figure 30 montre que, suite à l'intensification de la recherche de tuberculose bovine, le nombre de souches de *M.avium* spp et *M. nonchromogenicum* augmente depuis 2009 avec celui de *M. bovis*. *M. avium* spp est largement répandu sur le territoire, cependant un nombre de souches de *M. nonchromogenicum* supérieur est observé en 2013. Cette mycobactérie dont la proportion était jusque-là sous-estimée serait aussi répandue que *M. avium* spp, dont les interférences sur les tests ante-mortem et post-mortem sont connues.

ii. Identification des mycobactéries non tuberculeuse qui interfèrent dans le diagnostic

Il a été dénombré 36 (25%) autres MNT que *M. nonchromogenicum* et *M. avium* spp. Cependant, dans 11% des cas l'espèce n'a pas pu être déterminée (tableau 22).

Tableau 22 : Identification des MNT présentes dans le diagnostic de la tuberculose bovine

Souches	Nombre	%
M. nonchromogenicum	191	38,1
M. avium spp	129	25,7
Not identified	57	11,4
autres (< 1%)*	56	11,2
M. arupense like	12	2,4
M. terrae	12	2,4
M. aurum	8	1,6
M. kansasii	8	1,6
M. bourgelatii	7	1,4
M. scrofolaceum	6	1,2
M. engbaeki	5	1
M. heraklionense	5	1
M. intermedium	5	1

**M. austroafricanum, M. branderi, M. chimaera, M. chitae, M. elephantis, M. flavescens, M. fortuitum, M. gilvum, M. heckeshornense, M. holsaticum, M. insubricum, M. komossense, M. kumamotonense, M. llatzerense, M. monacense, M. neorum, M. phlei, M. porcinum, M. pulveris, M. pyrenivorans, M. rutilum, M. senuense, M. shimoidei, M. smegmatis, M. thermoresistibile, M. xenopi, M. vaccae*

c. Conclusion

M. nonchromogenicum est une mycobactérie environnementale retrouvée principalement dans la terre et l'eau, appartenant au complexe de *M terrae*. Dans le schéma diagnostic de la tuberculose bovine classique de la période analysée, la bactérie est isolée dans 30 % des cas de mycobactérioses. Dans la littérature, les cas d'infections dues à *M. avium spp* sont largement décrits aussi bien dans la faune sauvage que chez les bovins et représente 30% des souches isolées dans le diagnostic (Domingos et al., 2009 ; Muwonge et al., 2014 ; Raffo et al., 2017). À contrario peu de publications sont recensées pour des infections dues à *M. nonchromogenicum* (McCorry et al., 2004).

Les cas de réactions croisées avec *M. avium*, avec les tests de 1ère intention IDT sont relativement maîtrisés avec la mise en place de l'IDC et du dosage de l'interféron gamma. Cependant, aucune étude ne détermine l'impact de la forte proportion de *M. nonchromogenicum* sur le diagnostic de la tuberculose bovine.

3. Répartition géographique des mycobactéries atypiques en France

a. Matériel et méthodes

La répartition géographique des mycobactéries atypiques en France, a été étudiée sur un panel de 711 souches isolées de bovins (2012-2016) et identifiées au LNR. Les cartes géographiques sont élaborées avec le logiciel http://www.drawmeagraph.com/main.php.

b. Résultats

Le rythme de dépistage prophylactique dans les élevages est accru dans les départements de la Côte d'Or (21), de la Dordogne (24), des Landes (40), des Pyrénées Atlantiques (64) et de la Corse ; régions qui comptabilisent l'essentiel des foyers de TB. La figure 31 représente le nombre de souches de *M. bovis* répertoriées au niveau national entre 2012 et 2016 dans les cheptels bovins. Les zones fortement surveillées comptabilisent la plus grande quantité de *M. bovis*, et sont susceptibles de comptabiliser un nombre de MNT plus important.
Une variation géographique dans la répartition des MNT entre le Nord et le Sud de la France est observée (figure 32). Bien que le Sud-Ouest soit très surveillé, une très faible proportion de *M. nonchromogenicum* et *M. avium* est identifiée dans les départements du 64, 40 et également en Corse (figure 32). Dans le Nord de la France, région très peu surveillée, une quantité non négligeable de MNT est observée. Le ratio de *M. bovis*/MNT est de 3 dans le Sud et de 1 dans le Nord. Autrement dit, il y a 3 fois moins de MNT que de *M. bovis* dans le Sud alors que dans le Nord leurs proportions sont équivalentes.

c. Conclusion

Cette étude montre une différence dans la répartition géographique des mycobactéries non tuberculeuses. Les zones qui subissent une très forte pression de surveillance situées dans le Sud-Ouest de la France comptabilisent peu de MNT ce qui suggère que l'environnement dans cette zone est défavorable à leur survie. À contrario, il est recensé une forte proportion de MNT dans les zones qui subissent une faible pression de surveillance, ce qui suggère que la partie Nord de la France possède de meilleures conditions pour leur survie. Cette différence dans la répartition géographique des MNT peut s'expliquer par des disparités dans le taux d'ensoleillement, d'humidité, de végétation ou des conditions physico-chimique de la terre, entre le Nord et le Sud de la France. La même étude a été réalisée sur la faune sauvage (qui reflète de façon plus factuelle les MNT circulant dans l'environnement) et confirme ces observations (données non montrées). À ce jour, aucune étude pouvant expliquer ces variations dans la répartition géographique des MNT n'a été réalisée.

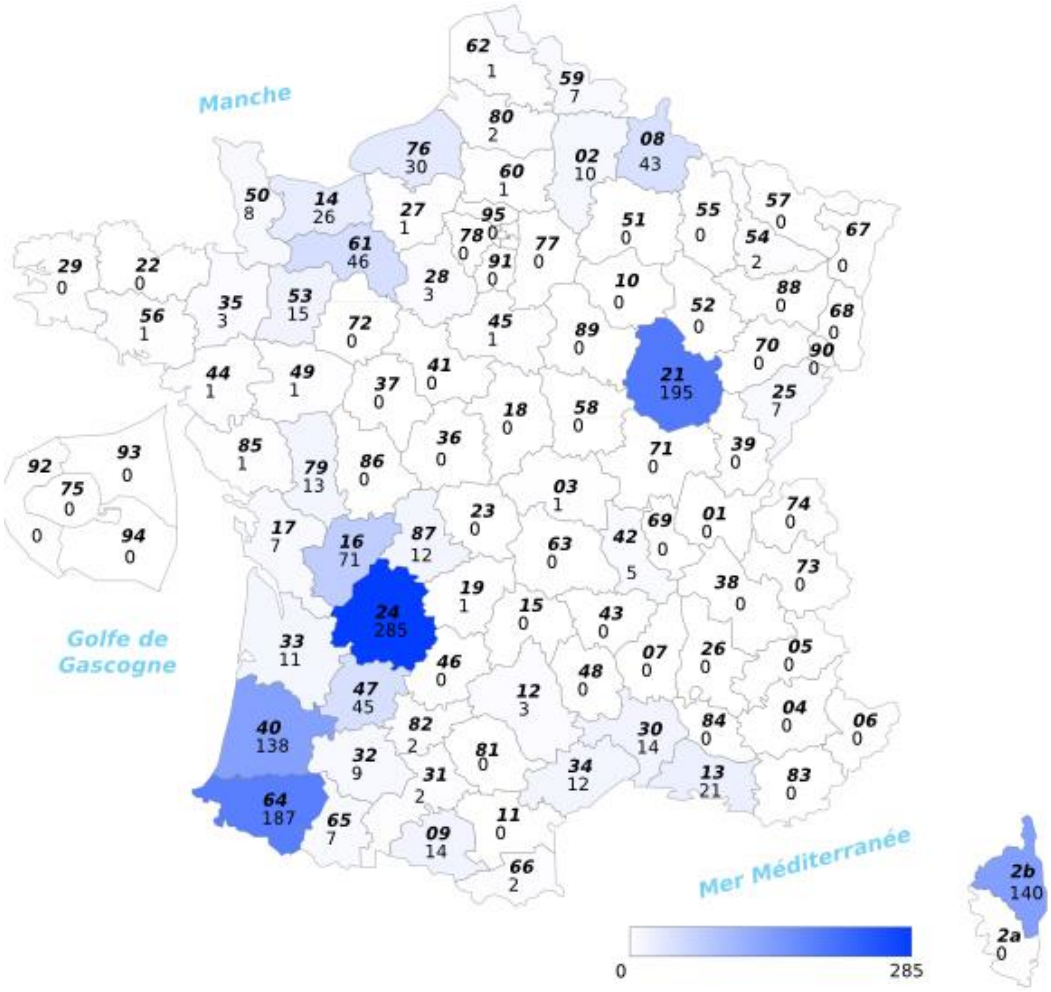


Figure 31 : Répartition géographique de *M. bovis* au sein des cheptels bovins (2012-2016)

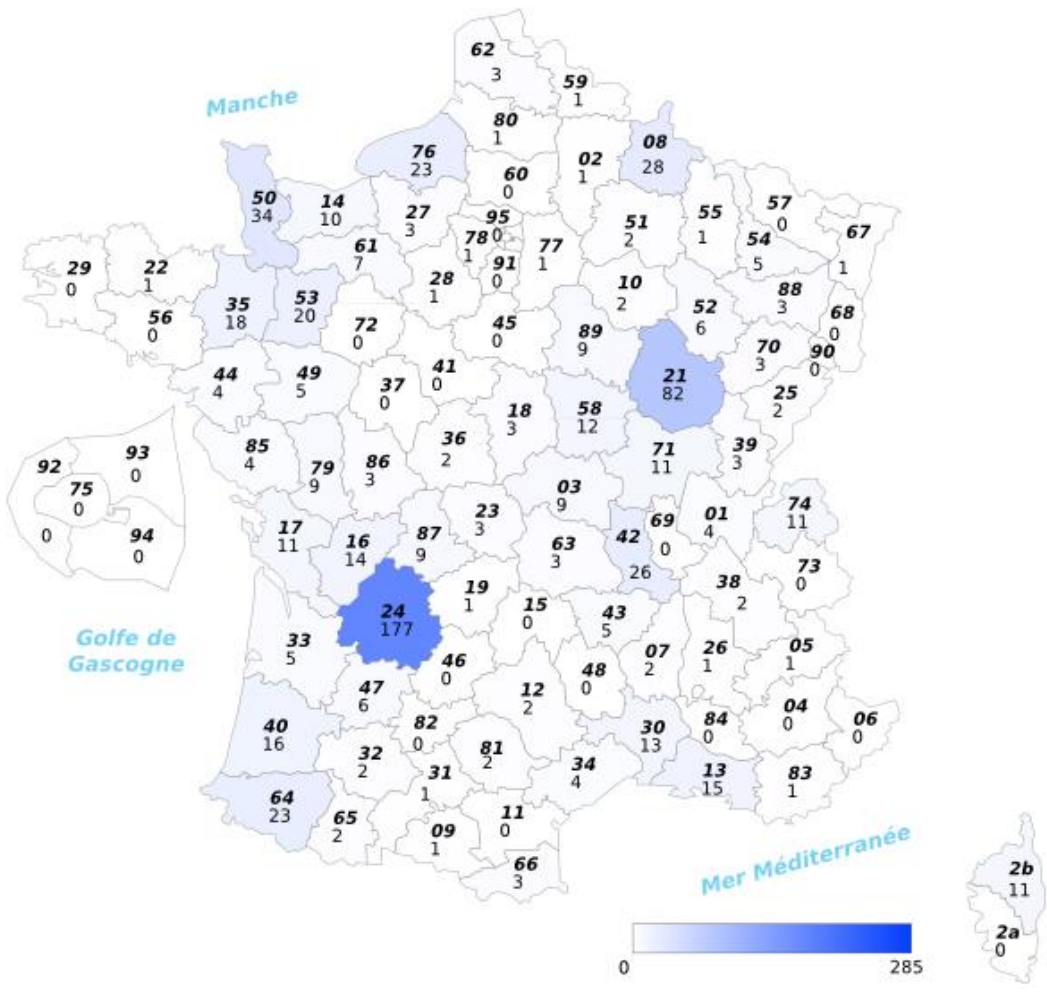


Figure 32 : Répartition géographique des mycobactéries atypiques au sein des cheptels bovins (2012-2016)

4. Étude de la prévalence de *M. avium* spp et *M. nonchromogenicum*

a. Matériel et méthode

Sur l'ensemble des données du LNR obtenues par les méthodes PCR en temps réel mises en place, la proportion de *M. avium* spp et *M.nonchromogenicum* en France a été étudiée sur un panel de 432 souches de MNT issues de bovins et 583 souches issues de la faune sauvage (sangliers, blaireaux, renards, cervidés, chevreuil) (2013-2015).

b. Résultats

La proportion de *M. nonchromogenicum* chez les bovins (38%) et la faune sauvage (37%) représente plus du tiers des mycobactéries atypiques recensées. Les 2 autres tiers sont partagés à hauteur de 30% pour *M. avium spp* dans les 2 populations et le dernier tiers comptabilise toutes les autres mycobactéries (tableau 23).
Dans le département endémique de la Côte d'Or (21), *M. nonchromogenicum* est identifié dans 65% des cas chez les bovins, 46 % chez les sangliers et 48% chez les blaireaux. *M. avium* spp est identifié à hauteur de 11%, 16% et 24% respectivement chez les bovins, les sangliers et les blaireaux. Il est clairement visualisé une prédominance de *M. nonchromogenicum* dans cette région (tableau 23).
En Dordogne (24), autre région endémique, la prédominance de *M. nonchromogenicum* est encore une fois démontrée avec 58% des cas chez les sangliers, 9% chez les blaireaux, et 40% chez les bovins (tableau 23).
On observe également une disparité géographique dans la dissémination de *M. avium spp* dans l'environnement entre le département 21 (moitié nord) et le 24 (moitié sud). Cette différence pourrait également s'expliquer par des facteurs externes climatiques et/ou physico-chimiques. Cet état de fait met en évidence une régionalisation potentielle dans la diversité des MNT identifiées dans la zone.

Tableau 23 : Étude de la proportion de *M. avium* spp et *M. nonchromogenicum* dans la faune sauvage et chez les bovins

	Population nationale			
	Sangliers	Blaireaux	FS	Bovins
M. nonchromogenicum	37% - (153)	37% - (52)	36% - (210)	38% - (164)
M. avium spp	30% - (122)	31% - (44)	30% - (177)	30% - (131)
M. spp	33% - (135)	32% - (45)	34% - (196)	32% - (137)
total	410	141	583	432
	Département de la Côte d'Or (21)			
	Sangliers	Blaireaux	FS (197)	Bovins
M. nonchromogenicum	46% - (17)	48% - (20)	43% - (41)	65% - (35)
M. avium spp	16% - (6)	24% - (10)	20% - (19)	11% - (6)
M. spp	38% - (14)	29% - (12)	37% - (35)	24% - (13)
total	37	42	95	54
	Département de la Dordogne (24)			
	Sangliers	Blaireaux	FS (243)	Bovins
M. nonchromogenicum	58% - (79)	9% - (2)	50% - (82)	40% - (39)
M. avium spp	31% - (43)	61% - (14)	37% - (60)	43% - (42)
M. spp	11% - (15)	30% - (7)	13% - (22)	16% - (16)
total	137	23	164	97

c. Conclusion

La faune sauvage et les élevages bovins à proximité partagent les mêmes mycobactéries et dans les mêmes proportions, ils peuvent alors être considérés comme des sentinelles de la population de mycobactéries non tuberculeuses circulant dans les cheptels de bovins. De plus, ces éléments tendent à démontrer encore une fois que les 2 faunes sont sensibles aux mêmes bactéries et appuient l'hypothèse d'un partage de micro-organismes qui peuvent interférer dans le diagnostic de la TB. Cet état de fait confirme l'existence d'un lien étroit entre la faune sauvage et domestique notamment dans la circulation de micro-organismes d'un point de vue global.

5. Étude de l'impact de la forte prévalence de *M. nonchromogenicum* et *M. avium* spp sur les tests de 1ère intention ante-mortem

a. Matériel et méthode

Les résultats des tests de 1ère intention (IDT et IFNɣ) de 45 bovins sur lesquels ont été identifiées des souches de *M. avium spp* ou *M. nonchromogenicum* au LNR ont été recensés. Ces souches sont originaires de la Dordogne (24) et identifiées durant la période 2013-2016. Les bovins appartiennent soit à des cheptels indemnes de tuberculose mais ayant présentés des réactions non négatives aux tests *ante-mortem*, soit à des cheptels infectés où l'abattage diagnostic a été pratiqué dans le cadre de l'assainissement sans que les animaux aient donné un résultat non-négatif aux tests *ante-mortem*. Les animaux sont négatifs aux analyses PCR réalisés aux LVD.

b. Résultats

Le tableau 24a montre que 36% des 45 bovins testés à l'IDT et à l'IFNɣ réagissent positivement ou de façon douteuse aux tests. Dans 24% des cas, *M. avium* spp est isolée sur les ganglions et dans 11% des cas, c'est *M. nonchromogenicum* qui est isolée.

Tableau 24a : Étude de l'impact de *M. avium spp* et *M. nonchromogenicum* sur les tests de 1ère intention

	test IDT/IFNɣ Négatifs	**test IDT/IFNɣ Non Négatifs**	**Total**
***M. avium* spp**	40%(18)	24%(11)	64%(29)
M. nonchromogenicum	24%(11)	11%(5)	36%(16)
Total	64%(29)	36%(16)	100%(45)

Le tableau 24b montre que pour les 45 bovins testés, 20 % des tests IDT sont faussement positifs, et dans 13.3% des cas *M. avium* spp est isolée alors que dans 6.7% des cas, c'est *M. nonchromogenicum.* De la même manière, 33% des tests IFNɣ sont faussement positifs, où *M. avium* spp est isolée dans 22% des cas et dans 11% des cas *M. nonchromogenicum*.

Tableau 24b : Étude de l'impact de *M. avium* et *M. nonchromogenicum* sur les tests de 1ère intention

	IDT Négative	**IDT Douteuse**	**IDT Positif**	**IFNɣ Négatif**	**IFNɣ Douteux**	**IFNɣ Positif**
***M. avium* spp**	51%(23)	4%(2)	9%(4)	42%(19)	13%(6)	9%(4)
M. nonchromogenicum	29%(13)	2%(1)	4%(2)	24%(11)	2%(1)	9%(4)
Total	80%(36)	6.7%(3)	13.3%(6)	67%(30)	15%(7)	18%(8)

c. Conclusion

Par cette étude, il est confirmé l'impact des MNT dans le diagnostic de la TB. Bien que la proportion de *M. avium spp* soit inférieure à celle de *M. nonchromogenicum,* elle conduit à plus de réactions faussement positives aux tests de dépistage ante-mortem que *M. nonchromogenicum*.

6. Conclusion globale

L'ensemble des thèmes abordés dans ce volet mettent en lumière la forte proportion de *M. nonchromogenicum* et *M. avium* spp sur le territoire français aussi bien dans la faune sauvage que domestique. La faune sauvage aux alentours des cheptels infectés reflète de façon plus factuelle la diversité des MNT qui circulent dans une zone ; les études sur la faune sauvage peuvent nous montrer indirectement les agents mycobactériens circulant chez les bovins qui comme dit précédemment, ingèrent de la terre dans les pâtures. Les raisons quant aux différences dans la répartition géographique des MNT restent à déterminer mais les résultats de cette étude suggèrent que la propagation des MNT est liée à des facteurs environnementaux propres à chaque région.
L'impact de *M. avium* spp et *M. nonchromogenicum* sur les tests de 1ère intention est net où *M. avium* spp interfère majoritairement dans les résultats faussement positifs bien qu'elle soit moins représentée que *M. nonchromogenicum* qui, elle, semble avoir un impact moindre. Ces 2 mycobactéries atypiques sont largement répandues sur le territoire et il n'est pas à exclure une éventuelle co-infection avec *M. bovis*. Elles peuvent également interférer dans les examens bactériologiques, surtout dans les cas où des lésions sont observées. Ces 2 mycobactéries à forte proportion interfèrent de façon directe dans le diagnostic de la tuberculose bovine et cette étude met en évidence *M. nonchromogenicum* dont la prévalence était jusqu'alors sous-estimée, et qui devient une MNT d'intérêt dans le processus de diagnostic.

Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives

La lutte contre la tuberculose bovine s'intensifie depuis 2004, date à laquelle les différents acteurs du plan de lutte ont été sensibilisés. Face à la recrudescence de la maladie, le réseau de laboratoires s'est organisé de manière à être plus réactif. Les méthodes de diagnostic se sont adaptées pour répondre aux attentes des éleveurs qui sont pénalisés par la lenteur du processus.

Le genre *Mycobacterium* comprend aujourd'hui plus de 150 espèces : le MTBC d'une part et les MNT d'autre part. L'étendue du genre complique le diagnostic de la TB avec l'observation de réactions croisées avec les tests *ante-mortem* ou *post-mortem*. Dans le cas de la surveillance de la TB au sein des cheptels bovins, au vue des conséquences drastiques d'une infection, le diagnostic doit être établi sans équivoque.

La mise en place de méthodes permettant l'établissement d'un diagnostic fiable et rapide, est primordiale pour la gestion de la TB. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, des techniques simples, rapides et spécifiques sont applicables.

Le système de détection moléculaire mis en place dans cette étude permet la caractérisation des mycobactéries impliquées dans le diagnostic. Il est utilisé de façon courante au laboratoire en batterie de tests et les informations récoltées par l'ensemble des analyses sur un même matériel génétique nous permettent de déterminer l'identité de la mycobactérie. La caractérisation des bactéries via l'étude des cibles *hsp65*, *hsp65*^{nc}, IS*1245*, IS*6110*, et IS*1081* a permis au LNR d'analyser 2560 souches et 2375 prélèvements, issus des prélèvements de bovins et de la faune sauvage de 2013 à 2016. De plus, dans le cadre des expertises du laboratoire, la mise en évidence de *Rhodococcus equi* comme agent pathogène interférant à forte échelle dans l'examen d'histopathologie permet au LNR d'apporter des éléments démontrant le manque de spécificité de l'analyse, mais surtout d'asseoir la fiabilité du système de détection employé sur le réseau (Michelet et al., 2016a). En outre, la PCR en temps réel a également permis de mettre en lumière la forte prévalence de 2 MNT dont une, *M. nonchromogenicum*, était sous-estimée et une disparité dans leur répartition géographique, qui suggère la présence de facteurs environnementaux propres à une zone donnée dans la circulation des MNT. L'étude a également montré la capacité de *M. avium* spp et *M. nonchromogenicum* à infecter la faune sauvage, appuyant l'hypothèse selon laquelle la faune sauvage peut servir de sentinelle et l'existence d'un lien étroit avec la faune domestique.

Dans le cadre d'une étude sur la mise en place de vaccins, la PCR sur le loci RD1 a permis la réalisation de tests préliminaires et a mis en lumière la diffusion du vaccin dans les tissus et la survie de la souche, ce qui permet d'orienter les prochaines investigations vers l'administration du vaccin chez les blaireaux par la voie oropharyngée.

L'optimisation du spoligotypage sur ADN extrait de prélèvements a permis au LNR d'analyser 1063 extraits de 2013 à 2016 et d'apporter des informations supplémentaires lors du suivi épidémiologique de *M. bovis* chez les bovins, la faune sauvage mais également dans l'environnement. Au sein de la faune sauvage, la forte circulation de *M. microti*, bactérie qui ne provoque pas une infection à déclaration obligatoire, a été démontrée. *M. microti* est une bactérie très difficile à isoler et très souvent n'est identifiée que par l'extraction d'ADN sur prélèvement. Cette technique nous permet de différencier *M. microti* de *M. bovis* de façon très rapide et efficace notamment dans la faune sauvage. Elle a également mis en lumière la diversité génétique de *M. microti* et la sous-estimation de la prévalence de cette dernière. Bien que l'infection due à *M. microti* ne soit pas considérée comme une maladie de catégorie 1, elle a un potentiel zoonotique, créé des lésions sur les tissus et interfère dans le diagnostic de la TB (Michelet et al., 2015a ; Michelet et al., 2015b). Depuis la mise en place de la méthode, l'analyse systématique des extraits sur prélèvement positif par le spoligotypage sur luminex a permis au LNR d'identifier *M. microti* chez une chèvre et une vache en 2015 (Michelet et al., 2016b). D'autre part, le LNR a pu mettre en évidence pour la 1ère fois en Forêt de Brotonne *M. microti* avec un spoligotype identifié uniquement en Italie jusque-là.
Cette méthode de détection moléculaire a également permis de mettre en évidence pour la première fois en France la présence de *M. bovis* dans l'environnement et suggère que l'environnement joue un rôle majeur dans la persistance de la maladie.

L'alliance du spoligotypage via le luminex et de la PCR en temps réel accélère la chaîne de diagnostic pouvant la réduire de moitié et complètent à l'heure actuelle les méthodes de références vieillissantes jusque-là considérées dans le diagnostic de la TB. À terme, les méthodes de biologie moléculaire pourraient remplacer les méthodes de référence qui alourdissent considérablement la chaîne de diagnostic. La PCR en temps réel et le spoligotypage, utilisés aussi bien en diagnostic qu'en recherche pour la détection et le typage des mycobactéries apportent les éléments nécessaires à la compréhension des mécanismes de transmission de la maladie entre la faune sauvage, l'environnement et la faune domestique. À ce titre, ces méthodes seront utilisées dans le cadre d'une étude sur la survie de *M. bovis* dans des extraits d'ADN issus d'amibes provenant de l'eau d'abreuvoirs collectée en Côte d'Or en collaboration avec l'INRA de Dijon. D'autre part, après une récente étude (Payne, 2014), le renard est suspecté de jouer un rôle majeur dans la circulation de la TB au sein de la faune sauvage. Dans le cadre d'un projet de recherche évalué par le Réseau Français de Santé Animale, la PCR en temps réel et le spoligotypage seront utilisés pour la détection de *M. bovis* chez le renard, aussi bien pour étudier le portage du bacille que pour sa capacité d'excrétion (fèces, urine…), afin de déterminer son statut et son rôle épidémiologique dans la faune sauvage.
Les nouvelles méthodes de séquençage du génome complet (WGS), permettent d'étudier

avec une très haute précision les modifications du génome à l'échelle du nucléotide. Ces méthodes mettent en évidences des « S*ingle Nucleotide Polymorphism* » (SNP) et complètent les méthodes de typage actuelles. Certains groupes clonaux préalablement mis en évidence par le spoligotypage et l'analyse VNTR (Hauer et al., 2015), ont pu être matérialisés via des SNP précis. Ces variations génétiques déjà identifiées pourront être multiplexées au spoligotypage dans le but d'augmenter la discrimination intra-espèce. Cette nouvelle approche, applicable sur la faune sauvage, les bovins et sur l'environnement, apportera des informations épidémiologiques supplémentaires rapides pour améliorer la compréhension des mécanismes de transmission de la TB et en faciliter la gestion.

D'autre part, bien que deux MNT majoritaires aient été identifiées, d'autres mycobactéries environnementales, sont à l'origine de réactions croisées avec les tests de 1ère intention. Au regard de la diversité du genre, un système permettant l'identification des mycobactéries via un système de puce micro-arrays haut débit mettra en lumière les principales mycobactéries responsables de résultats faussement positifs lors des tests de dépistages ante-mortem chez les bovins. Un projet de recherche évalué par le Réseau Français de Santé Animale débutera l'année prochaine pour étudier ce volet. Dans ce même but, le séquençage du génome complet de *M. nonchromogenicum*, jusque-là non considéré dans le diagnostic de la TB, permettra de déterminer si la bactérie possède des similarités avec *M. bovis* dans les protéines antigéniques impliquées dans les tests ante-mortem. Ces approches, permettront d'établir l'impact des MNT qui interfèrent dans le diagnostic de la TB, ayant pour objectifs de diminuer considérablement les pertes économiques dues au manque de spécificité des tests actuels, d'améliorer les connaissances et comprendre les défauts des actuels tests de dépistage déployés sur le terrain afin de les améliorer.

En conclusion, ce travail montre les perspectives et les avancées permises par les approches moléculaires, actuellement utilisées de façon combinée. Avec le multiplexage, les techniques génomiques devraient permettre d'accélerer encore le processus d'identification et d'optimiser les performances des plans de lutte.

Al-Soud, W.A., R\a adström, P., 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J. Clin. Microbiol. 38, 4463–4470.

Amato, B., Capucchio, T.M., Biasibetti, E., Mangano, E., Boniotti, B.M., Pacciarini, L.M., Migliore, S., Vitale, M., Fiasconaro, M., Di Marco Lo Presti, V., 2017. Pathology and genetic findings in a rare case of *Mycobacterium caprae* infection in a sow. Vet. Microbiol. 205, 71–74. doi:10.1016/j.vetmic.2017.05.010

ANSES, 2011. Rapport ANSES tuberculose bovine.pdf.

Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Súarez, G., others, 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 49, 1263–1273.

Armas, F., Furlanello, T., Camperio, C., Trotta, M., Novari, G., Marianelli, C., 2016. Molecular characterization and drug susceptibility profile of a *Mycobacterium avium* subspecies *avium* isolate from a dog with disseminated infection. J. Med. Microbiol. doi:10.1099/jmm.0.000221

Ashford, R.W., 2003. When is a reservoir not a reservoir? Emerg. Infect. Dis. 9, 1495–1496. doi:10.3201/eid0911.030088

Barbier, E., 2016. Manuscrit de thèse Prévalence de *Mycobacterium bovis* dans les agroécosystèmes: analyse de réservoirs environnementaux potentiels (sol, eau douce, faune du sol et faune aquatique) et traçage de la circulation de cette bactérie entre les différents compartiments. Université de Bourgogne Franche Comté.

Barbier, E., Boschiroli, M.L., Gueneau, E., Rochelet, M., Payne, A., de Cruz, K., Blieux, A.L., Fossot, C., Hartmann, A., 2016. First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine *tuberculosis*. J. Appl. Microbiol. 120, 1193–1207. doi:10.1111/jam.13090

Barbier, Elodie, Chantemesse, B., Rochelet, M., Fayolle, L., Bollache, L., Boschiroli, M.L., Hartmann, A., 2016. Rapid dissemination of *Mycobacterium bovis* from cattle dung to soil by the earthworm Lumbricus terrestris. Vet. Microbiol. 186, 1–7. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.025

Barbier, E., Rochelet, M., Gal, L., Boschiroli, M.L., Hartmann, A., 2017. Impact of temperature and soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment. PloS One 12, e0176315. doi:10.1371/journal.pone.0176315

Barrangou, R., Marraffini, L.A., 2014. CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. Mol. Cell 54, 234–244. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.011

Bavykin, S.G., Lysov, Y.P., Zakhariev, V., Kelly, J.J., Jackman, J., Stahl, D.A., Cherni, A., 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB Gene Sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of Bacillus cereus Group Microorganisms. J. Clin. Microbiol. 42, 3711–3730. doi:10.1128/JCM.42.8.3711-3730.2004

Bekara, M.E.A., 2014. Manuscript de thèse Impact de l'évolution du schéma de prophylaxie et des structures et pratiques d'élevage sur l'évolution de la tuberculose bovine en France entre les années 1965 et 2000: modélisation de l'incidence cheptel et de la dynamique de transmission intra-élevage de l'infection. Université Paris Sud-Paris XI.

Bekara, M.E.A., Azizi, L., Bénet, J.-J., Durand, B., 2016. Spatial-temporal Variations of Bovine Tuberculosis Incidence in France between 1965 and 2000. Transbound. Emerg. Dis. 63, 101–113. doi:10.1111/tbed.12224

Ben Salah, I., Cayrou, C., Raoult, D., Drancourt, M., 2009. *Mycobacterium* marseillense sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2803–2808. doi:10.1099/ijs.0.010637-0

Berg, S., Garcia-Pelayo, M.C., Muller, B., Hailu, E., Asiimwe, B., Kremer, K., Dale, J., Boniotti, M.B., Rodriguez, S., Hilty, M., Rigouts, L., Firdessa, R., Machado, A., Mucavele, C., Ngandolo, B.N.R., Bruchfeld, J., Boschiroli, L., Muller, A., Sahraoui, N., Pacciarini, M., Cadmus, S., Joloba, M., van Soolingen, D., Michel, A.L., Djonne, B., Aranaz, A., Zinsstag, J., van Helden, P., Portaels, F., Kazwala, R., Kallenius, G., Hewinson, R.G., Aseffa, A., Gordon, S.V., Smith, N.H., 2011. African 2, a Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Epidemiologically Important in East Africa. J. Bacteriol. 193, 670–678. doi:10.1128/JB.00750-10

Berg, Stefan, Garcia-Pelayo, M.C., Müller, B., Hailu, E., Asiimwe, B., Kremer, K., Dale, J., Boniotti, M.B., Rodriguez, S., Hilty, M., Rigouts, L., Firdessa, R., Machado, A., Mucavele, C., Ngandolo, B.N.R., Bruchfeld, J., Boschiroli, L., Müller, A., Sahraoui, N., Pacciarini, M., Cadmus, S., Joloba, M., van Soolingen, D., Michel, A.L., Djønne, B., Aranaz, A., Zinsstag, J., van Helden,

P., Portaels, F., Kazwala, R., Källenius, G., Hewinson, R.G., Aseffa, A., Gordon, S.V., Smith, N.H., 2011. African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. J. Bacteriol. 193, 670–678. doi:10.1128/JB.00750-10

Blanchong, J.A., Scribner, K.T., Kravchenko, A.N., Winterstein, S.R., 2007. TB-infected deer are more closely related than non-infected deer. Biol. Lett. 3, 103–105.

Blázquez, R., Ruiz-Serrano, M.J., Muñoz, P., Miralles, P., Pérez-Tascón, M., Bouza, E., 1997. [*Mycobacterium avium* complex infection: a growing problem in our country]. Rev. Clin. Esp. 197, 158–162.

Blouin, Y., Hauck, Y., Soler, C., Fabre, M., Vong, R., Dehan, C., Cazajous, G., Massoure, P.-L., Kraemer, P., Jenkins, A., Garnotel, E., Pourcel, C., Vergnaud, G., 2012. Significance of the Identification in the Horn of Africa of an Exceptionally Deep Branching *Mycobacterium tuberculosis* Clade. PLoS ONE 7, e52841. doi:10.1371/journal.pone.0052841

Boireau, C., 2015. Manuscript de thèse, Etude des caractéristiques intrinsèques du test interféron gamma utilisé en série suite à une intradermoculination dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine en France et enquête sociologique auprès des acteurs locaux.

Bos, K.I., Harkins, K.M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., Comas, I., Forrest, S.A., Bryant, J.M., Harris, S.R., Schuenemann, V.J., Campbell, T.J., Majander, K., Wilbur, A.K., Guichon, R.A., Wolfe Steadman, D.L., Cook, D.C., Niemann, S., Behr, M.A., Zumarraga, M., Bastida, R., Huson, D., Nieselt, K., Young, D., Parkhill, J., Buikstra, J.E., Gagneux, S., Stone, A.C., Krause, J., 2014. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. Nature 514, 494–497.

Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. Annu. Rev. Biochem. 64, 29–63. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333

Brosch, R., Gordon, S.V., Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos Santos, S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J.K., Golby, P., Garcia, J.N., Hewinson, R.G., Behr, M.A., Quail, M.A., Churcher, C., Barrell, B.G., Parkhill, J., Cole, S.T., 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 5596–5601. doi:10.1073/pnas.0700869104

Cavalerie, L., Courcoul, A., Boschiroli, M.L., Réveillaud, E., Gay, P., 2014. Tuberculose bovine. Santé Anim.-Aliment. 4.

Cleaveland, S., Laurenson, M.K., Taylor, L.H., 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356, 991–999. doi:10.1098/rstb.2001.0889

Conner, M.M., Ebinger, M.R., Blanchong, J.A., Cross, P.C., 2008. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1134, 146–172. doi:10.1196/annals.1439.005

Corner, L. a. L., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet. Microbiol. 112, 303–312. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.015

Coulombe, F., Divangahi, M., Veyrier, F., de Léséleuc, L., Gleason, J.L., Yang, Y., Kelliher, M.A., Pandey, A.K., Sassetti, C.M., Reed, M.B., Behr, M.A., 2009. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. J. Exp. Med. 206, 1709–1716. doi:10.1084/jem.20081779

Dastranj, M., Farahani, A., Hashemi Shahraki, A., Atashi, S., Mohajeri, P., 2017. Molecular identification and distribution of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens by PCR-sequencing method in West of Iran. Clin. Respir. J. doi:10.1111/crj.12617

Davis, J.L., Huang, L., Kovacs, J.A., Masur, H., Murray, P., Havlir, D.V., Worodria, W.O., Charlebois, E.D., Srikantiah, P., Cattamanchi, A., Huber, C., Shea, Y.R., Chow, Y., Fischer, S.H., 2009. Polymerase chain reaction of secA1 on sputum or oral wash samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 48, 725–732. doi:10.1086/597038

De Amorim, D.B., Casagrande, R.A., Alievi, M.M., Wouters, F., De Oliveira, L.G.S., Driemeier, D., Tavares, M., Ikuta, C.Y., Telles, E.O., Ferreira-Neto, J.S., 2014. *Mycobacterium pinnipedii* in a stranded South American sea lion (Otaria byronia) in Brazil. J. Wildl. Dis. 50, 419–422. doi:10.7589/2013-05-124

De la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of *tu*berculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res. Vet. Sci. 81, 190–210. doi:10.1016/j.rvsc.2005.11.005

DGAL, 2016. DGAL/SDSPA/2016-253 Sylvatub – changement de niveau de surveillance.

DGAL, 2011. Note de service DGAL/SDSPA/N2011-8214.

Domingos, M., Amado, A., Botelho, A., 2009. IS1245 RFLP analysis of strains of *Mycobacterium avium* subspecies hominissuis isolated from pigs with *tuberculosis* lymphadenitis in Portugal. Vet.

Rec. 164, 116–120.
Drancourt, M., Adékambi, T., Raoult, D., 2007. Interactions between *Mycobacterium xenopi*, amoeba and human cells. J. Hosp. Infect. 65, 138–142. doi:10.1016/j.jhin.2006.10.006
El Helou, G., Viola, G.M., Hachem, R., Han, X.Y., Raad, I.I., 2013. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. Lancet Infect. Dis. 13, 166–174. doi:10.1016/S1473-3099(12)70316-X
Favre, P., Garin-Bastuji, B., Boschiroli, M.-L., 2006. Bulletin épidémiologique N°21.
Freidlin, P.J., Nissan, I., Luria, A., Goldblatt, D., Schaffer, L., Kaidar-Shwartz, H., Chemtob, D., Dveyrin, Z., Head, S.R., Rorman, E., 2017. Structure and variation of CRISPR and CRISPR-flanking regions in deleted-direct repeat region *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. BMC Genomics 18. doi:10.1186/s12864-017-3560-6
GAO, B., Gupta, R.S., 2012. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76, 66–112. doi:10.1128/MMBR.05011-11
Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, Xin, Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, Xu, Zhang, J., Zhang, Y., 2017. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. Genome Biol. 18, 13. doi:10.1186/s13059-016-1144-4
Gcebe, N., Rutten, V., Gey van Pittius, N.C., Michel, A., 2013. Prevalence and Distribution of Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM) in Cattle, African Buffaloes (*Syncerus caffer*) and their Environments in South Africa. Transbound. Emerg. Dis. 60, 74–84. doi:10.1111/tbed.12133
Goh, K.S., Fabre, M., Huard, R.C., Schmid, S., Sola, C., Rastogi, N., 2006. Study of the gyrB gene polymorphism as a tool to differentiate among *Mycobacterium tuberculosis* complex subspecies further underlines the older evolutionary age of "*Mycobacterium canettii*." Mol. Cell. Probes 20, 182–190. doi:10.1016/j.mcp.2005.11.008
Goodfellow, M., Whitman, W.B., Bergey, D.H. (Eds.), 2012. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 5 [...]: The Actinobacteria [...], 2. ed. ed. Springer, New York, NY.
Gordon, S.V., Heym, B., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S.T., 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiol. Read. Engl. 145 (Pt 4), 881–892. doi:10.1099/13500872-145-4-881
Gortazar, C., Torres, M.J., Acevedo, P., Aznar, J., Negro, J.J., de la Fuente, J., Vicente, J., 2011. Fine-tuning the space, time, and host distribution of mycobacteria in wildlife. BMC Microbiol. 11, 27. doi:10.1186/1471-2180-11-27
Guerrero, C., C. Bernasconi, D. Burki, T. Bodmer, and A. Telenti. "A Novel Insertion Element from Mycobacterium Avium, IS1245, Is a Specific Target for Analysis of Strain Relatedness." Journal of Clinical Microbiology 33, no. 2 (February 1995): 304–7.
Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V., 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 1, e5. doi:10.1371/journal.ppat.0010005
Halse, T.A., Escuyer, V.E., Musser, K.A., 2011. Evaluation of a Single-Tube Multiplex Real-Time PCR for Differentiation of Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 49, 2562–2567. doi:10.1128/JCM.00467-11
Hauer, A., De Cruz, K., Cochard, T., Godreuil, S., Karoui, C., Henault, S., Bulach, T., Bañuls, A.-L., Biet, F., Boschiroli, M.L., 2015. Genetic Evolution of *Mycobacterium bovis* Causing *Tuberculosis* in Livestock and Wildlife in France since 1978. PLOS ONE 10, e0117103. doi:10.1371/journal.pone.0117103
Hauer, A., Michelet, L., De Cruz, K., Cochard, T., Branger, M., Karoui, C., Henault, S., Biet, F., Boschiroli, M.L., 2016. MIRU-VNTR allelic variability depends on *Mycobacterium bovis* clonal group identity. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 45, 165–169. doi:10.1016/j.meegid.2016.08.038
Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerg. Infect. Dis. 8, 1468–1473. doi:10.3201/eid0812.010317
Hénault, S., Karoui, C., Boschiroli, M.L., 2006. A PCR-based method for tuberculosis detection in wildlife. Dev. Biol. 126, 123-132; discussion 325-326.
Higgins, J., Camp, P., Farrell, D., Bravo, D., Pate, M., Robbe-Austerman, S., 2011. Identification of *Mycobacterium* spp. of veterinary importance using rpoB gene sequencing. BMC Vet. Res. 7, 77.
Huard, R.C., de Oliveira Lazzarini, L.C., Butler, W.R., van Soolingen, D., Ho, J.L., 2003. PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. J. Clin. Microbiol. 41, 1637–1650. doi:10.1128/JCM.41.4.1637-1650.2003
Hughes, M.S., Ball, N.W., McCarroll, J., Erskine, M., Taylor, M.J., Pollock, J.M., Skuce, R.A., Neill, S.D., 2005. Molecular analyses of mycobacteria other than the M. *tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. Vet. Microbiol. 108, 101–112.

doi:10.1016/j.vetmic.2005.03.001
Humblet, M.-F., Boschiroli, M.L., Saegerman, C., 2009. Classification of worldwide bovine *tuberculosis* risk factors in cattle: a stratified approach. Vet. Res. 40, 50. doi:10.1051/vetres/2009033
Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J. Bacteriol. 169, 5429–5433.
Jahans, K., Palmer, S., Inwald, J., Brown, J., Abayakoon, S., 2004. Isolation of *Mycobacterium microti* from a male Charolais-Hereford cross. Vet. Rec. 155, 373–374.
Kaden, V., Lange, E., Müller, T., Teuffert, J., Teifke, J.P., Riebe, R., 2006. Protection of gruntlings against classical swine fever virus-infection after oral vaccination of sows with C-strain vaccine. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 53, 455–460. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00993.x
Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35, 907–914.
Kaneene, J.B., Hattey, J.A., Bolin, C.A., Averill, J., Miller, R., 2017. Survivability of *Mycobacterium bovis* on salt and salt-mineral blocks fed to cattle. Am. J. Vet. Res. 78, 57–62.
Kaprelyants, A.S., Gottschal, J.C., Kell, D.B., 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 10, 271–285.
Kazda, J. (Ed.), 2009. The ecology of mycobacteria: impact on animal's and human's health, 2nd ed. ed. Springer, Dordrecht ; London.
Keck, N., Godreuil, S., Boschiroli, L., 2013. Aspect zoonotique et pathogénie des infections des poissons par les mycobactéries. Point Vét.
Keck, N., Moyen, J.-L., Gueneau, É., Boschiroli, M.-L., 2014. PARTICULARITÉS DU DÉPISTAGE ET DU DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE BOVINE.
Keller, A.P., Beggs, M.L., Amthor, B., Bruns, F., Meissner, P., Haas, W.H., 2002. Evidence of the Presence of IS1245 and IS1311 or Closely Related Insertion Elements in Nontuberculous Mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* Complex. J. Clin. Microbiol. 40, 1869–1872. doi:10.1128/JCM.40.5.1869-1872.2002
Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., Van Soolingen, D., Koëter, G., 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis. 12, 1469–1473.
Koeck, J.-L., Fabre, M., Simon, F., Daffé, M., Garnotel, E., Matan, A.B., Gérôme, P., Bernatas, J.-J., Buisson, Y., Pourcel, C., 2011. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli "*Mycobacterium canettii*" infection suggest the existence of an environmental reservoir. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17, 1013–1019. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03347.x
Kremer, K., Bunschoten, A., Schouls, L., van Soolingen, D., van Embden, J., 1997. a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Res. Lab. Infect. Dis. Natl. Inst. Public Health Environ. Bilthoven.
Ladron, N., Fernandez, M., Aguero, J., Zorn, B.G., Vazquez-Boland, J.A., Navas, J., 2003. Rapid Identification of *Rhodococcus equi* by a PCR Assay Targeting the choE Gene. J. Clin. Microbiol. 41, 3241–3245. doi:10.1128/JCM.41.7.3241-3245.2003
Lei, H., Xu, Y., Chen, J., Wei, X., Lam, D.M.-K., 2010. Immunoprotection against influenza H5N1 virus by oral administration of enteric-coated recombinant Lactococcus lactis mini-capsules. Virology 407, 319–324. doi:10.1016/j.virol.2010.08.007
Liu, H., Lian, L., Jiang, Y., Huang, M., Tan, Y., Zhao, X., Zhang, J., Yu, Q., Liu, J., Dong, H., Lu, B., Wu, Y., Wan, K., 2016. Identification of Species of Nontuberculous Mycobacteria Clinical Isolates from 8 Provinces of China. BioMed Res. Int. 2016, 2153910. doi:10.1155/2016/2153910
Louwen, R., Staals, R.H.J., Endtz, H.P., van Baarlen, P., van der Oost, J., 2014a. The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 78, 74–88. doi:10.1128/MMBR.00039-13
Louwen, R., Staals, R.H.J., Endtz, H.P., van Baarlen, P., van der Oost, J., 2014b. The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 78, 74–88. doi:10.1128/MMBR.00039-13
Lugton, I.W., Wilson, P.R., Morris, R.S., Nugent, G., 1998. Epidemiology and pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection of red deer (Cervus elaphus) in New Zealand. N. Z. Vet. J. 46, 147–156. doi:10.1080/00480169.1998.36079
Mahairas, Gregory G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K., 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent M. *bovis*. J. Bacteriol. 178, 1274–1282.
Mahairas, G. G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K., 1996. Molecular analysis of

genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent M. *bovis*. J. Bacteriol. 178, 1274–1282.
Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A., Daffé, M., 2014. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. Chem. Biol. 21, 67–85. doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011
McCorry, T.P., McCormick, C.M., Hughes, M.S., Pollock, J.M., Neill, S.D., 2004. *Mycobacterium* nonchromogenicum in nasal mucus from cattle in a herd infected with bovine *tuberculosis*. Vet. Microbiol. 99, 281–285. doi:10.1016/j.vetmic.2003.12.006
McNabb, A., Eisler, D., Adie, K., Amos, M., Rodrigues, M., Stephens, G., Black, W.A., Isaac-Renton, J., 2004. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (hsp65) for Routine Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Clinical Sources. J. Clin. Microbiol. 42, 3000–3011. doi:10.1128/JCM.42.7.3000-3011.2004
Michel, A.L., Bengis, R.G., Keet, D.F., Hofmeyr, M., Klerk, L.M. de, Cross, P.C., Jolles, A.E., Cooper, D., Whyte, I.J., Buss, P., Godfroid, J., 2006. Wildlife *tuberculosis* in South African conservation areas: implications and challenges. Vet. Microbiol. 112, 91–100. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.035
Michelet, L., De Cruz, K., Phalente, Y., Bulach, T., Karoui, C., Hénault, S., Boschiroli, M.L., 2016a. Le Diagnostic de la tuberculose bovine en France : la biologie moléculaire à la rescousse de l'histopathologie Épidémiol. et santé anim., 2016, 70, 51-58.
Michelet, L., de Cruz, K., Phalente, Y., Karoui, C., Hénault, S., Beral, M., Boschiroli, M.L., 2016b. *Mycobacterium* microti Infection in Dairy Goats, France. Emerg. Infect. Dis. 22, 569–570. doi:10.3201/eid2203.151870
Michelet, L., de Cruz, K., Phalente, Y., Karoui, C., Hénault, S., Boschiroli, M.L., 2015a. *Mycobacterium* microti detection in French wildlife. Vet. Rec. 177, 446. doi:10.1136/vr.h5754
Michelet, L., de Cruz, K., Zanella, G., Aaziz, R., Bulach, T., Karoui, C., Hénault, S., Joncour, G., Boschiroli, M.L., 2015b. Infection with *Mycobacterium* microti in Animals in France. J. Clin. Microbiol. 53, 981–985. doi:10.1128/JCM.02713-14
Müller, B., Hilty, M., Berg, S., Garcia-Pelayo, M.C., Dale, J., Boschiroli, M.L., Cadmus, S., Ngandolo, B.N.R., Godreuil, S., Diguimbaye-Djaibé, C., Kazwala, R., Bonfoh, B., Njanpop-Lafourcade, B.M., Sahraoui, N., Guetarni, D., Aseffa, A., Mekonnen, M.H., Razanamparany, V.R., Ramarokoto, H., Djønne, B., Oloya, J., Machado, A., Mucavele, C., Skjerve, E., Portaels, F., Rigouts, L., Michel, A., Müller, A., Källenius, G., van Helden, P.D., Hewinson, R.G., Zinsstag, J., Gordon, S.V., Smith, N.H., 2009. African 1, an epidemiologically important clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. J. Bacteriol. 191, 1951–1960. doi:10.1128/JB.01590-08
Murcia, M.I., 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2049–2054. doi:10.1099/ijs.0.64190-0
Muwonge, A., Oloya, J., Kankya, C., Nielsen, S., Godfroid, J., Skjerve, E., Djønne, B., Johansen, T.B., 2014. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from humans, cattle and pigs in the Uganda cattle corridor using VNTR analysis. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 21, 184–191. doi:10.1016/j.meegid.2013.11.012
Niemann, S., Richter, E., Dalügge-Tamm, H., Schlesinger, H., Graupner, D., Königstein, B., Gurath, G., Greinert, U., Rüsch-Gerdes, S., 2000. Two cases of *Mycobacterium microti* derived *tuberculosis* in HIV-negative immunocompetent patients. Emerg. Infect. Dis. 6, 539–542. doi:10.3201/eid0605.000516
Nugent, G., 2011. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine *tuberculosis* in multi-host wildlife complexes: a New Zealand case study. Vet. Microbiol. 151, 34–42. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.023
OMS, 2016. Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde 2016.
O'Reilly, L.M., Daborn, C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis. 76 Suppl 1, 1–46.
Palisson, A., 2016. Rôles des contacts entre bovins dans la circulation d'agents infectieux. Importance respective du commerce et du pâturage pour la tuberculose bovine. Université Paris-Saclay.
Palmer, M.V., Waters, W.R., Whipple, D.L., 2004. Shared feed as a means of deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. J. Wildl. Dis. 40, 87–91. doi:10.7589/0090-3558-40.1.87
Payne, A., 2014. Manuscript de thèse Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de *Mycobacterium bovis* et risque de transmission entre faune sauvage et bovins : étude expérimentale en Côte d'Or.
Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res. Vet. Sci. 74, 1–15.
Pileggi, S.M., Jordan, H., Clennon, J.A., Whitney, E., Benbow, M.E., Merritt, R., McIntosh, M., Kimbirauskas, R., Small, P., Boakye, D., Quaye, C., Qi, J., Campbell, L., Gronseth, J.,

Ampadu, E., Opare, W., Waller, L.A., 2017. Landscape and environmental influences on *Mycobacterium ulcerans* distribution among aquatic sites in Ghana. PloS One 12, e0176375. doi:10.1371/journal.pone.0176375
Prescott, J.F., 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 4, 20–34.
Primm, T.P., Lucero, C.A., Falkinham, J.O., 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 17, 98–106.
Prodinger, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschiroli, M.L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Skrypnyk, A., Erler, W., Niemann, S., Pavlik, I., Moser, I., 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. J. Clin. Microbiol. 43, 4984–4992. doi:10.1128/JCM.43.10.4984-4992.2005
Raffo, E., Steuer, P., Monti, G., Salgado, M., 2017. Effect of *Mycobacterium avium* subsp. para*tuberculosis* (MAP) infection on the diagnostic accuracy for *Mycobacterium bovis* (*M. bovis)* infection under field conditions in cattle belonging to low *M. bovis* prevalence herds. Trop. Anim. Health Prod. 49, 771–775. doi:10.1007/s11250-017-1259-y
Rezaee, S., Mojgani, N., Mosavari, N., Hashmi, M., 2016. Strain differentiation of 13 indigenous *Mycobacterium bovis* isolates from infected cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. Int. J. Mycobacteriology 5 Suppl 1, S224–S225. doi:10.1016/j.ijmyco.2016.10.020
Rindi, L., Garzelli, C., 2014. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. Infect. Genet. Evol. 21, 375–383. doi:10.1016/j.meegid.2013.12.007
Rivière Julie, Reveillaud, Edouard, Boschiroli, M.L., Hars, J., Richomme, C., Faure Eva, Hendrilkx, Pascal, Fediaevsky, A., 2013. Sylvatub : bilan d'une première année de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage en France. Bull. Épidémiologique 57, 4.
Rodriguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Domínguez, L., García-de-Viedma, D., Aranaz, A., 2013. Splitting of a Prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype by Variable-Number Tandem-Repeat Typing Reveals High Heterogeneity in an Evolving Clonal Group. J. Clin. Microbiol. 51, 3658–3665. doi:10.1128/JCM.01271-13
Rodriguez-Campos, S., Schürch, A.C., Dale, J., Lohan, A.J., Cunha, M.V., Botelho, A., Cruz, K.D., Boschiroli, M.L., Boniotti, M.B., Pacciarini, M., Garcia-Pelayo, M.C., Romero, B., de Juan, L., Domínguez, L., Gordon, S.V., van Soolingen, D., Loftus, B., Berg, S., Hewinson, R.G., Aranaz, A., Smith, N.H., 2012. European 2 – A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. Infect. Genet. Evol. 12, 866–872. doi:10.1016/j.meegid.2011.09.004
Rodriguez-Campos, S., Smith, N.H., Boniotti, M.B., Aranaz, A., 2014. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine *tuberculosis*. Res. Vet. Sci. 97 Suppl, S5–S19. doi:10.1016/j.rvsc.2014.02.009
Ruettger, A., Nieter, J., Skrypnyk, A., Engelmann, I., Ziegler, A., Moser, I., Monecke, S., Ehricht, R., Sachse, K., 2012. Rapid spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by use of a microarray system with automatic data processing and assignment. J. Clin. Microbiol. 50, 2492–2495. doi:10.1128/JCM.00442-12
Sanchez-Hidalgo, A., Obregón-Henao, A., Wheat, W.H., Jackson, M., Gonzalez-Juarrero, M., 2017. *Mycobacterium bovis* hosted by free-living-amoebae permits their long-term persistence survival outside of host mammalian cells and remain capable of transmitting disease to mice: *M. bovis* infected amoebic cysts can transmit *tuberculosis*. Environ. Microbiol. doi:10.1111/1462-2920.13810
Savini, V., Fazii, P., Favaro, M., Astolfi, D., Polilli, E., Pompilio, A., Vannucci, M., D'Amario, C., Di Bonaventura, G., Fontana, C., D'Antonio, D., 2012. *Tuberculosis*-like pneumonias by the aerobic actinomycetes *Rhodococcus*, *Tsukamurella* and Gordonia. Microbes Infect. 14, 401–410. doi:10.1016/j.micinf.2011.11.014
Shariat, N., Dudley, E.G., 2014. CRISPRs: Molecular Signatures Used for Pathogen Subtyping. Appl. Environ. Microbiol. 80, 430–439. doi:10.1128/AEM.02790-13
Sigurdson B, 1945. A specific antigen recovered from tissus infected with M. para*tuberculosis* (John's bacillus).
Smith, G.C., 2001. Models of *Mycobacterium bovis* in wildlife and cattle. Tuberc. Edinb. Scotl. 81, 51–64. doi:10.1054/tube.2000.0264
Smith, I., 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clin. Microbiol. Rev. 16, 463–496. doi:10.1128/CMR.16.3.463-496.2003
Smith, N.H., Berg, S., Dale, J., Allen, A., Rodriguez, S., 2011. European-1-A-globally-important-clonal-complex-of-*Mycobacterium-bovis*_2011_Infection-Genetics-and-Evolution.pdf.
Smith, N.H., Crawshaw, T., Parry, J., Birtles, R.J., 2009. *Mycobacterium microti*: More Diverse than Previously Thought. J. Clin. Microbiol. 47, 2551–2559. doi:10.1128/JCM.00638-09
Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Locht, C., Supply, P., Rastogi, N., 2003. Genotyping of the

Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 3, 125–133.

Slana, I., M. Kaevska, P. Kralik, A. Horvathova, and I. Pavlik. “Distribution of Mycobacterium Avium Subsp. Avium and M. A. Hominissuis in Artificially Infected Pigs Studied by Culture and IS901 and IS1245 Quantitative Real Time PCR.” Veterinary Microbiology 144, no. 3–4 (August 2010): 437–43. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.024.

Stahl, D.A., Urbance, J.W., 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J. Bacteriol. 172, 116–124.

Supply, P., Niemann, S., Wirth, T., 2011. On the mutation rates of spoligotypes and variable numbers of tandem repeat loci of *Mycobacterium tuberculosis*: Continued-When tuning matters. Infect. Genet. Evol. 11, 1191.

Talbot, Elizabeth A., Diana L. Williams, and Richard Frothingham. “PCR Identification of Mycobacterium Bovis BCG.” Journal of Clinical Microbiology 35, no. 3 (1997): 566–69.

Tang, L., Zeng, Y., Du, H., Gong, M., Peng, J., Zhang, B., Lei, M., Zhao, F., Wang, W., Li, X., Liu, J., 2017. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. Mol. Genet. Genomics MGG 292, 525–533. doi:10.1007/s00438-017-1299-z

Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G., 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2428–2438. doi:10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006

Tortoli, E., 2014. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. Clin. Microbiol. Rev. 27, 727–752. doi:10.1128/CMR.00035-14

Tortoli, E., 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium* chimaera sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1277–1285. doi:10.1099/ijs.0.02777-0

Tortoli, E., 2003. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. Clin. Microbiol. Rev. 16, 319–354. doi:10.1128/CMR.16.2.319-354.2003

Tortoli, E., Gitti, Z., Klenk, H.-P., Lauria, S., Mannino, R., Mantegani, P., Mariottini, A., Neonakis, I., 2013. Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium* terrae complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 401–411. doi:10.1099/ijs.0.038737-0

Trujillo, M.E., Velázquez, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., 2004. *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1459–1463. doi:10.1099/ijs.0.02938-0

Van der Geize, R., Grommen, A.W.F., Hessels, G.I., Jacobs, A.A.C., Dijkhuizen, L., 2011. The Steroid Catabolic Pathway of the Intracellular Pathogen *Rhodococcus equi* Is Important for Pathogenesis and a Target for Vaccine Development. PLoS Pathog. 7, e1002181. doi:10.1371/journal.ppat.1002181

Van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M.J., Simeone, R., Brosch, R., van Soolingen, D., 2012. Characterization of *Mycobacterium* orygis as M. *tuberculosis* complex subspecies. Emerg. Infect. Dis. 18, 653–655. doi:10.3201/eid1804.110888

Van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., van Embden, J.D., 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 1236–1245. doi:10.1099/00207713-47-4-1236

Velayati, A.A., Farnia, P., Mozafari, M., Malekshahian, D., Farahbod, A.M., Seif, S., Rahideh, S., Mirsaeidi, M., 2015. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from water and soil samples of a metropolitan city. Chest 147, 1094–1102. doi:10.1378/chest.14-0960

Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J.M., Fernández-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C., 2007. Risk factors associated with the prevalence of *tuberculosis*-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. Vet. Res. 38, 451–464. doi:10.1051/vetres:2007002

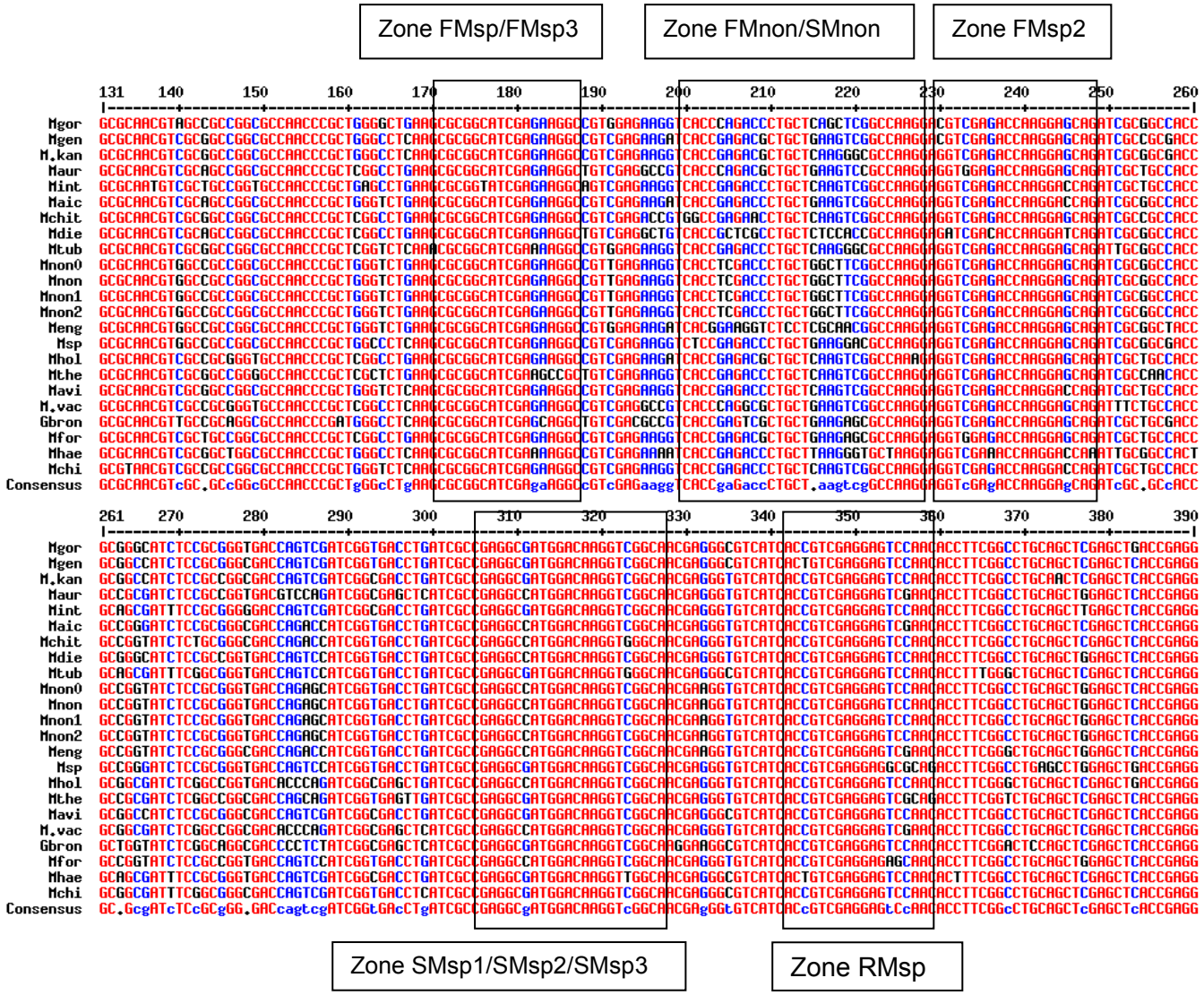
Vourc’h, G., Boyard, C., Barnouin, J., 2008. Mammal and bird species distribution at the woodland-pasture interface in relation to the circulation of ticks and pathogens. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 322–325. doi:10.1196/annals.1428.093

Wang, J., McIntosh, F., Radomski, N., Dewar, K., Simeone, R., Enninga, J., Brosch, R., Rocha, E.P., Veyrier, F.J., Behr, M.A., 2015. Insights on the Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the Analysis of *Mycobacterium kansasii*. Genome Biol. Evol. 7, 856–870. doi:10.1093/gbe/evv035

Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesseling, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M.C., Chege, G.K., Victor, T.C., Hoal, E.G., van Helden, P.D., 2006. Differentiation of

Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis. 10, 818–822.
Weiner, B., Raman, S., Dolganov, G., Peterson, M., Riley, R., Abeel, T., White, J., Sisk, P., Stolte, C., Koehrsen, M., others, 2012. Comparative analysis of *mycobacterium* and related actinomycetes yields insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis.
Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Rüsch-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., Meyer, A., Supply, P., Niemann, S., 2008. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. PLoS Pathog. 4, e1000160. doi:10.1371/journal.ppat.1000160
Woodroffe, R., Donnelly, C.A., Wei, G., Cox, D.R., Bourne, F.J., Burke, T., Butlin, R.K., Cheeseman, C.L., Gettinby, G., Gilks, P., Hedges, S., Jenkins, H.E., Johnston, W.T., McInerney, J.P., Morrison, W.I., Pope, L.C., 2009. Social group size affects *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (Meles meles). J. Anim. Ecol. 78, 818–827. doi:10.1111/j.1365-2656.2009.01545.x
Woolhouse, M.E., Taylor, L.H., Haydon, D.T., 2001. Population biology of multihost pathogens. Science 292, 1109–1112.
Zanella, G., Duvauchelle, A., Hars, J., Moutou, F., Boschiroli, M.L., Durand, B., 2008. Patterns of lesions of bovine *tuberculosis* in wild red deer and wild boar. Vet. Rec. 163, 43–47.
Zelazny, A.M., Calhoun, L.B., Li, L., Shea, Y.R., Fischer, S.H., 2005. Identification of *Mycobacterium* Species by secA1 Sequences. J. Clin. Microbiol. 43, 1051–1058. doi:10.1128/JCM.43.3.1051-1058.2005
Zhang, J., Abadia, E., Refregier, G., Tafaj, S., Boschiroli, M.L., Guillard, B., Andremont, A., Ruimy, R., Sola, C., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of “spoligotyping” with new spacers and a microbead-based hybridization assay. J. Med. Microbiol. 59, 285–294. doi:10.1099/jmm.0.016949-0

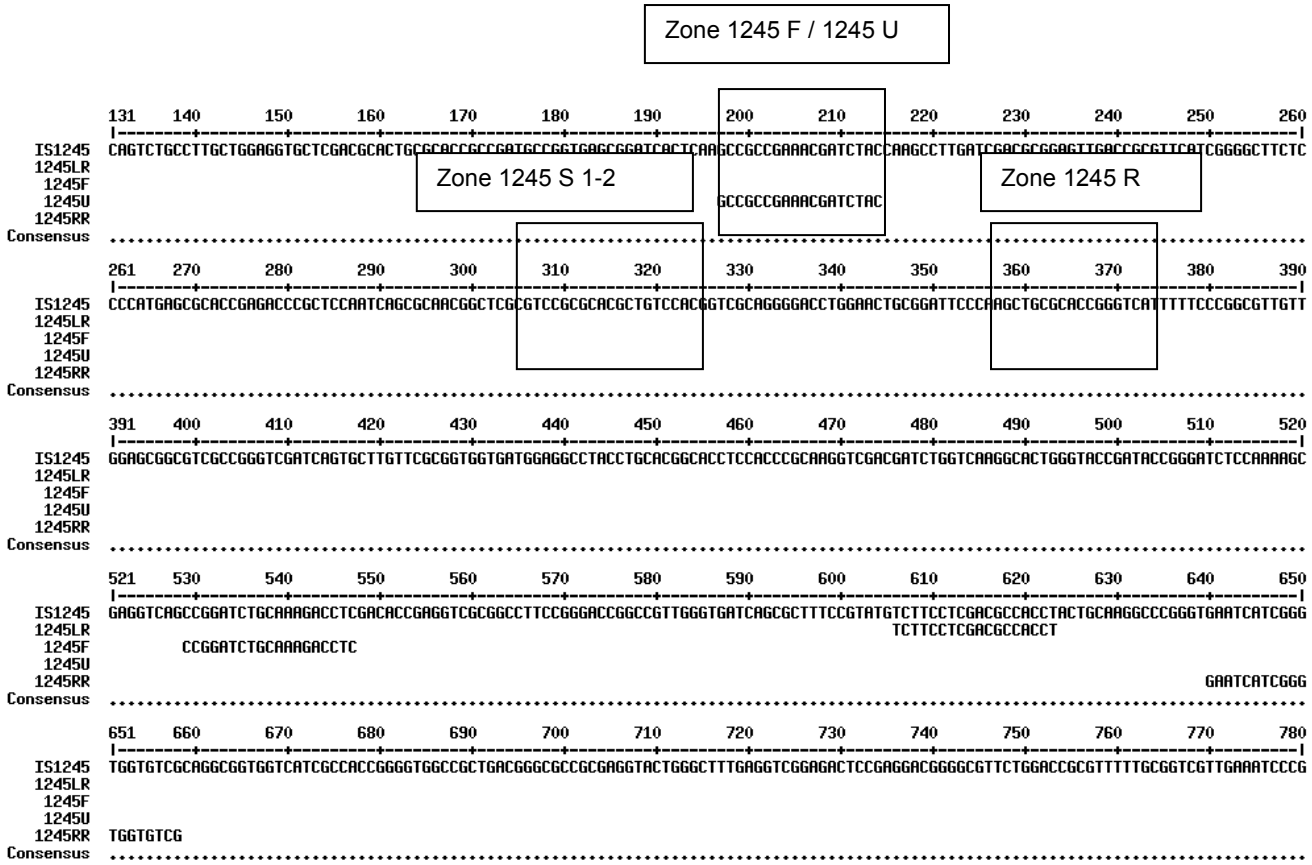
Annexe 1 : Alignement des séquences du gène *hsp65* / Design des oligonucléotides



Oligo	Séquence 5'→3'	Tm °C	Chimie
R Msp	ctc ctc gac ggt gat gac	58.2	Fam-BHQ1
F Msp	ctg aag cgc ggc atc ga	57.6	Fam-BHQ1
F Msp2	gcc aag gag gtc gag acc aa	61.4	Fam-BHQ1
F MSp3	ctS aag cgc ggc atc ga	57.6	Fam-BHQ1
F Non	aag gtc acc tcg acc ctg ctg gct tc	69.5	Fam-BHQ1
S Msp1	atc gcc gag gcg atg gac aag gt	66	Fam-BHQ1
S Msp2	acc ttg tcc atc gcc tcg gcg at	66	Fam-BHQ1
S Msp3	cc atS gcc tcg gcg at	56.9	Fam-BHQ1-MGB
S Non1	aag gtc acc tcg acc ctg ctg gct tc	69.5	Fam-BHQ1

S xx : sonde de la cible xx , F xx : amorce « Forward » sens de la cible xx, R xx : amorce « Reverse » anti-sens de la cible xx. Alignement (par multalign) des séquences du gène *hsp65* obtenues par séguençage (données LNR). Les encadrés définnissent l'emplacement des différents *designs* d'oligonucléotides dessinés. Tm : *melting temperature* , Fam : fluorophore couplé à l'extrémité 5' de la sonde, BHQ1 : *Black Hole Quencher* 1 fixé en extrémité 3' de la sonde.

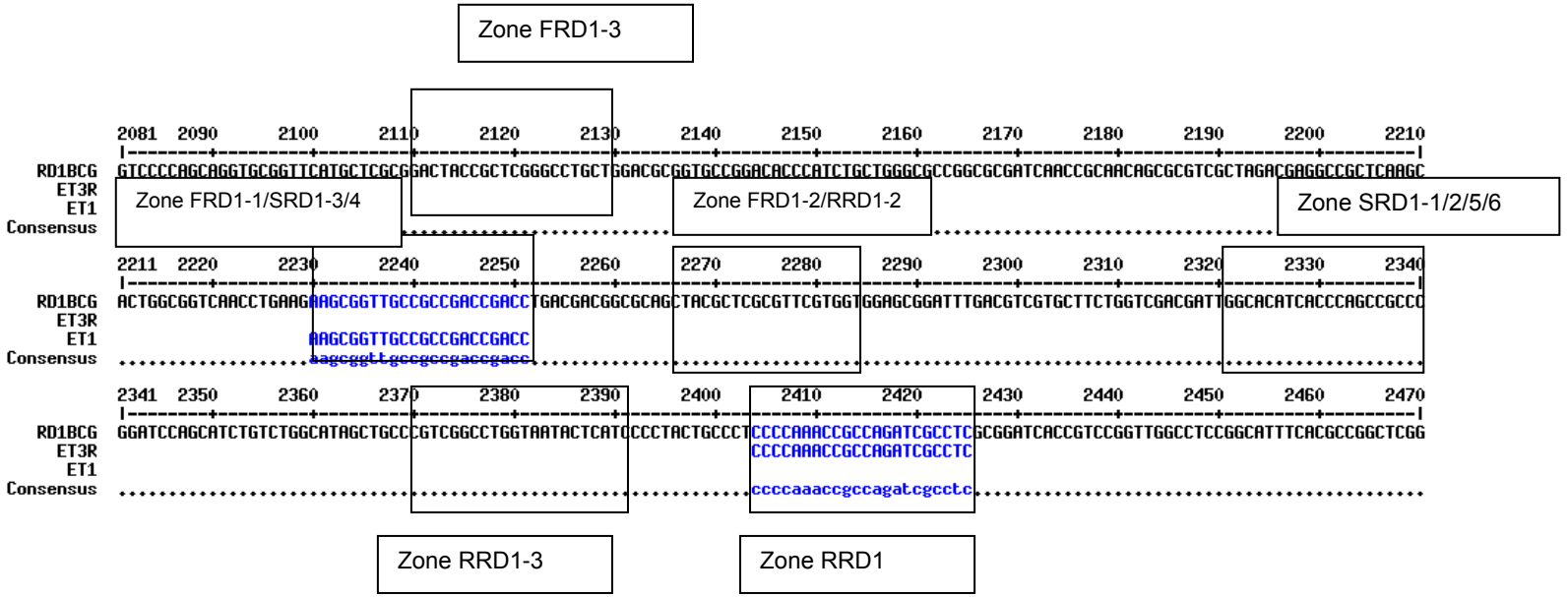
Annexe 2 : Alignement des séquences du gène *IS1245* / Design des oligonucléotides



Oligo	Séquence 5'→3'	Tm °C	Chimie
F1245	gcc gcc gaa acg atc tac	58.2	Fam-BHQ1
R1245	tga ccc ggt gcg cag ctt	60.5	Fam-BHQ1
S1245-1	tcg cgt ccg cgc acg ctg tcc a	69.5	Fam-BHQ1
S1245-2	tgg aca gcg tgc gcg gac gcg a	69.5	Fam-BHQ1

S xx : sonde de la cible xx , F xx : amorce « Forward » sens de la cible xx, R xx : amorce « Reverse » anti-sens de la cible xx. Alignement (par multalign) des séquences du gène IS*1245* (export de la base de donnée NCBI *accession number* : L33879) et des couples d'amorces 1245LR/1245U et 1245F/1245RR (Guerrero et al. 1995)et (Slana et al, 2010). Les encadrés définissent l'emplacement des différents *designs* d'oligonucléotides dessinés. Tm : *melting temperature* , Fam : fluorophore couplé à l'extrémité 5' de la sonde, BHQ1 : *Black Hole Quencher* 1 fixé en extrémité 3' de la sonde.

Annexe 3 : Alignement des séquences du gène RD1 / Design des oligonucléotides



Oligo	Séquence 5'→3'	Tm °C	Chimie
RD1 R	gag gcg atc tgg cgg ttt g	60	Fam-BHQ1
RD1 R-2	cac cac gaa cgc gag cgt a	58.2	Fam-BHQ1
RD1 R-3	gat gag tat tac cag gcc gac	60	Fam-BHQ1
RD1 F	aag cgg ttg ccg ccg ac	61	Fam-BHQ1
RD1F-2	tac gct cgc gtt cgt ggt	61	Fam-BHQ1
RD1F-3	act acc gct cgg gcc tg	59.8	Fam-BHQ1

Oligo	Séquence 5'→3'	Tm °C	Chimie
SRD1 -1	tgg cac atc acc cag ccg ccc	67.6	Fam-BHQ1
SRD1 -2	ggg cgg ctg ggt gat gtg cca	67.6	Fam-BHQ1
S RD1-3	aag cgg ttg ccg ccg acc gac ct	69.6	Fam-BHQ1
S RD1-4	agg tcg gtc ggc ggc aac cgc tt	69.6	Fam-BHQ1
S RD1-5	gca cat cac cca gcc gcc cgg a	69.6	Fam-BHQ1
S RD1-6	tcc ggg cgg ctg ggt gat gtg c	69.6	Fam-BHQ1

S xx : sonde de la cible xx , F xx : amorce « Forward » sens de la cible xx, R xx : amorce « Reverse » anti-sens de la cible xx. Alignement (par multalign) des séquences du gène RD1 (export de la base de donnée NCBI *accession number* : U35019) et des couples d'amorces ET3/ET1 dessinées par (Talbot et al., 1997). Les encadrés définissent l'emplacement des différents *designs* d'oligonucléotides dessinés. Tm : *melting temperature* , Fam : fluorophore couplé à l'extrémité 5' de la sonde, BHQ1 : *Black Hole Quencher* 1 fixé en extrémité 3' de la sonde.

Annexe 4 : Étude de l'effet matrice sur les PCR et choix du master mix

Échantillon	taux de dilution	Master mix Fast Advanced (Ct CI)	Master mix Universal (Ct CI)	
13Z005274	Pure	31	34	L'effet matrice matérialisé par l'introduction d'un contrôle interne* (CI), conformément à la norme NFU-47-600 dans chaque échantillon est annulé par le Master mix Fast. Exemple : l'échantillon 13Z005275 est positif dans le 1er cas et négatif dans le 2nd.
13Z005274	1/10	34	31	
13Z005275	Pure	31	Nég	
13Z005275	1/10	34	33	
13Z005276	Pure	31	48	
13Z005276	1/10	33	33	
13Z005278	Pure	31	45	
13Z005278	1/10	33	33	
13Z005279	Pure	31	40	
13Z005279	1/10	33	33	
13Z005395	Pure	31	36	
13Z005395	1/10	33	33	

Résultats obtenus par PCR en temps réel pour la comparaison des deux masters mix et la mise en évidence de l'effet matrice. Contrôle interne * : « Internal Positive Control » (Diagenode), valeur Ct : *cycle treshold* ,

Annexe 5 : Étude préliminaire des couples d'oligonucléotides pour la détection de *M. spp*

Échantillon	Identification souche	RMSP FMSP1 SMSP1 (Ct)	RMSP FMSP1 SMSP2 (Ct)	RMSP FMSP2 SMSP1 (Ct)	RMSP FMSP2 SMSP2 (Ct)	RMSP FMSP2 SMSP3 (Ct)	RMSP FMSP SMSP3 (Ct)
13Z000264	*M. sp*	Nég	36,1	Nég	27,3	32,3	Nég
13Z000293	Négatif	Nég		Nég	Nég	Nég	22,9
13Z000301	*M. sp*	Nég	18,9	Nég	18,6	20,9	21,5
13Z000330	*M. avium*	Nég	22,1	Nég	21,5	23,8	21,7
13Z000335	*M. sp*	Nég	29,6	Nég	26,6	22,3	23,4
13Z000537	*M.sp*	Nég	28,5	Nég	25,0	21,7	19,9
13Z000538	*M. bovis*	Nég	24,5	Nég	21,6	23,8	Nég
	T -	Nég	Nég	Nég	Nég	41,0	31,1
Observation générale		Non conforme / aucune détectection	Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante	Non conforme / aucune détectection	Conforme / allure des courbes satisfaisante	Non conforme	Non conforme

Résultats obtenus par PCR en temps réel pour les tests préliminaires au design des oligonucléotides et choix des couples.Surligné en bleu : couple d'oligonucléotides choisi ; Nég : négatif, valeur Ct : *cycle treshold,* S xx : sonde de la cible xx , F xx : amorce « Forward » sens de la cible xx, R xx : amorce « Reverse » anti-sens de la cible xx.

Annexe 6 : Étude préliminaire des couples d'oligonucléotides pour la détection de *M. nonchromogenicum*

Échantillon	**Identification souche**	RMSP FMnon **SMSP3** (Ct)	RMSP FMSP3 **Snon1** (Ct)	RMSP FMSP3 **SMSP3** (Ct)	RMSP FMSP2 **SMSP3** (Ct)	RMSP FMSP3 **SMSP1** (Ct)
10Z001926	*M. avium*	Nég	Nég	26,9	25,4	25,4
13Z001748	*M. nc**	21,5	23,5	21,8	21,6	27,0
MRI FB	*M. bovis*	Nég	Nég	27,5	25,6	28,9
13Z001601	*M. sp*	Nég	Nég	17,9	17,2	20,7
13Z001726	*M. sp*	Nég	Nég	22,7	22,4	21,3
13Z001733	*Négatif*	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
13Z001722	*M.sp*	Nég	Nég	21,8	22,4	26,2
	T-	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Observation générale		Conforme	Conforme	Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante	Non conforme / Manque de spécificité	Non conforme / Manque de spécificité

Résultats obtenus par PCR en temps réel pour les tests préliminaires au design des oligonucléotides et choix des couples. *M. nc* : M. nonchromogenicum ;* Surligné en bleu : couple d'oligonucléotides choisi ; Nég : négatif, valeur Ct : *cycle treshold*

S xx : sonde de la cible xx , F xx : amorce « Forward » sens de la cible xx, R xx : amorce « Reverse » anti-sens de la cible xx.

Annexe 7 : Étude préliminaire des couples d'oligos pour la détection de *M. bovis*^{BCG} et de *M. avium*

Échantillon	Identification souche	FRD1 RRD1 SRD1-1 (Ct)	FRD1 RRD1 SRD1-2 (Ct)	FRD1-2 RRD1 SRD1-1 (Ct)	FRD1-2 RRD1 SRD1-2 (Ct)	FRD1-3 RRD1-2 SRD1-3 (Ct)	FRD1-3 RRD1-2 SRD1-4 (Ct)	FRD1-1 RRD1-3 SRD1-5 (Ct)	FRD1-1 RRD1-3 SRD1-6 (Ct)	FRD1-2 RRD1-3 SRD1-5 (Ct)	FRD1-2 RRD1-3 SRD1-6 (Ct)	F1245 R1245 S1245-1 (Ct)	F1245 R1245 S1245-2 (Ct)
13Z002135	*M. bovis*^{BCG} (CIP0550)	19	21	24	Nég	16	17	19,3	14,3	18,1	13,46	Nég	39
13Z002529	*M. bovis*	Nég	Nég	Nég	Nég	15	15	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
78-6288	*M. africanum*	Nég	Nég	Nég	Nég	19	19	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	37
78-1777	*M. caprae*	Nég	Nég	Nég	Nég	17	17	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
13Z004244	*M. microtii*	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	36	40
MRI	*M. tuberculosis*	Nég	Nég	Nég	Nég	36	36	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
78-4770	*M. pinnipedii*	Nég	Nég	Nég	Nég	19	19	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
D13-2331	*M. nonchromogenicum*	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
13Z001926	*M. avium spp*	Nég	Nég	Nég	Nég	34	37	Nég	Nég	Nég	Nég	15	16
	T-	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Observation générale		Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante	Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante	Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante	Non conforme / aucune détectecti on	Non conforme / détection du MTBC hors *M. microti*	Non conforme / détection du MTBC hors *M. microti*	Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante	Conforme	Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante	Conforme	Conforme	Non conforme / Allure des courbes **non** satisfaisante

Résultats obtenus par PCR en temps réel pour les tests préliminaires au design des oligonucléotides et choix des couples. MRI : matériel de référence interne.

Surligné en bleu : couple d'oligonucléotides choisi ; Nég : négatif, valeur Ct : *cycle treshold,*

S xx : sonde de la cible xx , F xx : amorce « Forward » sens de la cible xx, R xx : amorce « Reverse » anti-sens de la cible xx.

Annexe 8 : Résultats de la spécificité inclusive

Souche	*hsp65*^{nc} (Ct)	IS*1245* (Ct)	*hsp65* (Ct)	RD1 ^{BCG} (Ct)	RD1 (Ct)	IS*6110* (Ct)	IS*1081* (Ct)	IS*1561* (Ct)	RD4 (Ct)
M. caprae	Nég	Nég	22	Nég	21	17	19	21	20
M. avium	Nég	21	22	Nég	Nég	38	Nég	Nég	Nég
M. paratuberculosis	Nég	41	20	Nég	40	38	Nég	Nég	Nég
M. avium hominissuis	Nég	13	20	Nég	39	Nég	Nég	Nég	Nég
M. chelonae	Nég	33	24	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
M. flavescens	Nég	39	20	Nég	19	Nég	Nég	Nég	39
M. fortuitum	Nég	32	23	Nég	35	Nég	Nég	26	Nég
M. gordonae	Nég	33	21	Nég	40	35	Nég	37	Nég
M. intermedium	Nég	Nég	23	Nég	Nég	Indet	Nég	Nég	Nég
M. intracellulare	Nég	Nég	17	Nég	Nég	Indet	Nég	Nég	Nég
M. kansasi	Nég	35	18	Nég	Nég	48	Nég	Nég	Nég
M. marinium	Nég	34	19	Nég	35	Nég	Nég	Nég	39
M. paraffinicum	Nég	Nég	23	Nég	40	Nég	Nég	Nég	Nég
M. smegmatis	Nég	Nég	26	Nég	37	Nég	Nég	Nég	Nég
M. phlei	Nég	38	23	Nég	Nég	Indet	Nég	Nég	Nég
M. terrae complex	Nég	39	20	Nég	Nég	37	39	Nég	Nég
M. triviale	Nég	39	21	Nég	40	Indet	48	Nég	Nég
M. xenopi	Nég	37	20	Nég	34	Nég	32	Nég	Nég
M. nonchromogenicum	21	Nég	22	Nég	40	39	Nég	Nég	Nég
M. bovis	Nég	Nég	37	Nég	22	12	16	17	Nég
M. microti	Nég	Nég	19	Nég	38	15	18	Nég	19
M. pinnipedi	Nég	39	21	Nég	Nég	15	17	Nég	18
M. africanum	Nég	Nég	21	Nég	23	16	17	19	17
M. BCG	NT	NT	NT	21	Nég	NT	NT	NT	NT

Résultats obtenus par PCR en temps réel, pour l'étude de la spécificité inclusive (seuil de positivité fixé à 25). Nég : négatif ; NT : non testé ; valeur Ct : *cycle treshold.*

Annexe 9 : Résultats de la spécificité exclusive

Espèce	*hsp65*^{nc} (Ct)	IS *1245* (Ct)	*hsp65* (Ct)	RD1^{BCG} (Ct)	RD1 (Ct)	IS *6110* (Ct)	IS *1081* (Ct)	IS *1561* (Ct)	RD4 (Ct)
Staphylococcus epidermidis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Serratia marcescens	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Acinetobacter baumannii	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Salmonella arbotusovis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
OchrobactruM. anthropi	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Streptomyces.ssp	Nég	Nég	22	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Corynebacterium bovis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella.abortus S19	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella.suis 1	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella.ovis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella.canis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella.pinnipediae	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella melitensis 3	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella melitensis Rev1	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Brucella abortus 3	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Xanthomonas maltophilia	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Streptococcus equi subsp. Equi	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Staphylococcus haemolyticus	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Bacillus subtilis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Campylobacter sputorum biovar Fecalis	Nég	Nég	38	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Bordetella bronchiseptica	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Candida albicans	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Klebsiella pneumoniae	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Enterococcus faecalis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	21	37	Nég	Nég
Streptococcus pyogenes	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Proteus mirabilis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Pseudomonas aeruginosa	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Salmonella typhimurium	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Pasteurella multocida	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég

Annexe 9 : Résultats de la spécificité exclusive (suite)

Espèce	*hsp65*^{nc} (Ct)	IS *1245* (Ct)	*hsp65* (Ct)	RD1^{BCG} (Ct)	RD1 (Ct)	IS *6110* (Ct)	IS *1081* (Ct)	IS *1561* (Ct)	RD4 (Ct)
Yersinia pseudotuberculosis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Listeria monocytogenes	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Listeria welshimeri	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Staphylococcus.aureus	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Streptococcus pneumoniae	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Enterobacter aerogenes	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Streptococcus faecium	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Aeromonas hydrophila	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Coynebacterium pseudotuberculosis (ovis)	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Rhodococcus equi	Nég	Nég	25	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Yersinia	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Streptococcus bovis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Streptococcus.agalactiae	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
streptococcus.dysgalactiae	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Bacillus brevis	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Escherichia coli	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég
Morganella morganii	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég

Résultats obtenus par PCR en temps réel, pour l'étude de la spécificité exclusive. Nég : négatif, valeur Ct : *cycle treshold,*

Annexe 10 : Résultats de la détermination de la LD95 des cibles pour la discrimination des MNT

Souche	Amorce	Nombre de copie/cupules	Positivité total (%)	LDpcr
M. avium. avium	IS*1245*	240	100	15
		120	100	
		60	100	
		30	100	
		15	100	
		8	71	
		4	34	
		2	0	
M. nomchromogenicum	*hsp*65^{nc}	270	100	34
		135	100	
		68	100	
		34	96	
		17	67	
		8	29	
		4	4	
		2	0	

Résultats obtenus par PCR en temps réel pour l'étude de la limite de détection à 95%, conformément à la norme NF U47-600 (8 niveaux de concentration, 3 sessions, 8 réplicats par niveau) avec minimum 95 % de résultats positifs.

Annexe 11 : Résultats de la détermination de la LD95 des cibles pour la discrimination des MTBC

Souche	Amorce	Nombre de copie/cupules	Positivité total (%)	LDpcr
M. bovis **(extrait par phénol/chlorophorme 10µg/ml)**	*hsp*65	110	100	14
		55	100	
		28	100	
		14	100	
		7	88	
		3	83	
		2	33	
		1	0	
	RD1	110	100	28
		55	100	
		28	96	
		14	83	
		7	79	
		3	33	
		2	13	
		1	13	
	IS*6110*	110	100	14
		55	100	
		28	100	
		14	96	
		7	83	
		3	30	
		2	8	
		1	0	
	IS*1081*	11	100	3
		6	100	
		3	96	
		1	83	
		1	75	
		0	59	
		0	0	
		0	0	
	IS*1561*	11	100	6
		6	100	
		3	55	
		1	30	
		1	17	
		0	0	
		0	0	
		0	0	

Annexe 11 : Résultats de la détermination de la LD95 des cibles pour la discrimination des MTBC (suite)

Souche	Amorce	Nombre de copie/cupules	Positivité total (%)	LDpcr
***M. microti* (13Z004244)**	RD4	25	100	6
		13	100	
		6	100	
		3	83	
		2	0	
		1	0	
		0	0	
		0	0	

Résultats obtenus par PCR en temps réel pour l'étude de la limite de détection à 95%, conformément à la norme NF U47-600 (8 niveaux de concentration, 3 sessions, 8 réplicats par niveau) avec minimum 95 % de résultats positifs.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Développement et mise en place d'un système de détection moléculaire pour la tuberculose bovine

De Cruz Krystel

Date de soutenance

RÉSUMÉ

La tuberculose bovine (TB) est une maladie zoonotique à déclaration obligatoire justifiant un engagement financier et humain de l'Etat sur des actions de surveillance et de lutte en élevage, dont l'agent causal majeur est *Mycobacterium bovis.* Avec un taux de prévalence au niveau du cheptel faible (< 0.01%), la France est considérée indemne de tuberculose bovine (OIT) par l'Union Européenne depuis 2001. Néanmoins, depuis 2004 avec l'intensification du plan de surveillance, il est observé une recrudescence de la TB dans certaines régions mettant ainsi en péril ce statut OIT.

M. bovis, dont le réservoir principal est le bovin, est capable d'infecter un très large spectre de mammifères dont l'homme et de persister dans l'environnement. La circulation de la TB est multifactorielle, le rôle de la faune sauvage et de l'environnement restant à déterminer. Le plan de surveillance de la TB chez les bovins est basé sur un système de dépistage/abattage programmé au niveau national, avec l'inspection/détection de lésions évocatrices de TB à l'abattoir, qui sont prélevées, analysées par histologie et mises en culture (selon la méthode officielle de la Directive européenne 64/432). *M. bovis* est une bactérie à croissance lente (3 mois), ce qui implique une chaine de diagnostic pouvant aller jusqu'à 6 mois avec des outils diagnostic *ante-*/*post*-mortem, qui présentent souvent un manque de spécificité au regard de la diversité du genre *Mycobacterium.* Dans un contexte de faible prévalence, le diagnostic de la TB doit être rapide, fiable et simple dans le but de faciliter la gestion de la crise et limiter les pertes économiques.

Dans ce mémoire de diplôme EPHE, je présente l'élaboration d'un système de détection et d'identification des mycobactéries impliquées ou interférant dans le diagnostic de la TB à l'aide d'une méthode PCR et du spoligotypage. L'identification par PCR en temps réel des bactéries repose sur l'amplification de 9 cibles génétiques selon une validation réalisée suivant la norme NF-U-47-600. L'analyse des échantillons par spoligotypage a été axée sur l'optimisation de la méthode pour la rendre applicable directement à des ADN extraits de prélèvements (animal ou environnemental).

L'association des 2 méthodes de détection moléculaire a permis d'une part d'augmenter la sensibilité du diagnostic chez l'animal avec l'identification dans 95% des cas des mycobactéries tuberculeuses incriminées mais également l'identification d'autres actinomycétales responsables de réactions croisées dans les tests ante-mortem. Les méthodes développées ont par ailleurs permis la réalisation d'essais préliminaires dans l'étude de l'élaboration d'un vaccin oral chez les blaireaux. Il a permis également la détection de l'agent causal de la maladie dans des prélèvements de l'environnement prouvant ainsi le rôle de ceux-ci dans des cycles de transmission multifactoriels-multi-hôtes.

En conclusion, les méthodes de détection moléculaire développées dans le cadre de ce projet permet au Laboratoire National de Référence (LNR) d'accélérer la chaine de diagnostic et de gestion de la maladie ainsi que d'améliorer les connaissances sur les mécanismes de transmission de la tuberculose bovine.

MOTS-CLÉS ***:*** *(Tuberculose bovine, Diagnostic moléculaire, test ante-mortem et post-mortem, PCR en temps réel, spoligotypage)*