

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES PREMIERS ISOLEMENTS DE MYCOBACTERIES CHEZ L'ANIMAL AU TCHAD*

**Esther Schelling¹, Colette Diguimbaye², Markus Hilty¹,
Franca Baggi³, Richard Ngandolo² et Jakob Zinsstag¹**

RESUME : Le premier laboratoire de culture des mycobactéries a été établi au Tchad pour confirmer la présence de la tuberculose bovine chez le bétail et pour évaluer la répartition des souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Les prélèvements ont été réalisés sur des carcasses d'animaux saisis pour cause de tuberculose. Le typage moléculaire par spoligotypie et le typage des VNTR (séquences répétées en nombre variable) ont été réalisés avec 67 souches *M. bovis* du Tchad. La prévalence de lésions tuberculeuses à l'abattoir était de 7,3%. Davantage de carcasse de zébus M'bororos ont été saisies par rapport aux zébus Arabes ($p = 0,04$); une saisie totale en comparaison à une saisie partielle a été plus souvent effectuée chez les Mbororos ($p \leq 0,001$) et *M. bovis* a été plus fréquemment isolé chez les zébus Mbororos que chez les Arabes ($p = 0,004$). Le spoligotypage a révélé les mêmes caractéristiques que les souches isolées au Nord du Cameroun. Le spoligotypage a regroupé >90% des isolements en groupes et l'analyse de 12 loci MIRU-VNTR 84%. Trois autres loci VNTRs (ETRA, B, et C) ont eu un pouvoir discriminant plus élevé par rapport aux MIRUs qui sont plus discriminants pour *M. tuberculosis* que pour *M. bovis*.

Mots-clés : Tchad, zoonose, *Mycobacterium bovis*, culture, spoligotypage, MIRU, VNTR.

SUMMARY : The first laboratory to culture mycobacteria was established in Chad to confirm the presence of bovine tuberculosis and to describe the distribution of *M. tuberculosis* complex strains in livestock and humans. Specimens were collected on condemned animal carcasses due to tuberculosis. Spoligotyping and analysis of Variable Numbers Tandem Repeats (VNTRs) have been used on 67 *M. bovis* strains.

The prevalence of tuberculosis-like lesions at the slaughterhouse was 7.3%. More M'bororo than Arab zebus were condemned ($p = 0.04$), M'bororo carcasses were more often entirely condemned in comparison to a partial condemnation ($p \leq 0.001$) and *M. bovis* was more often isolated from Mbororo carcasses than from Arab zebu ($p = 0.004$). Spoligotyping showed same characteristics between Chadian and North Cameroonian strains. Spoligotyping classified >90% of strains in clusters and analysis of 12 MIRU-VNTR loci 84%. Three other VNTR loci (ETRA, B, and C) showed a higher discriminatory power than MIRU loci that are more discriminative for *M. tuberculosis* than *M. bovis* strains. The appropriate method for the distinction between *M. bovis* strains needs first to be identified. In Chad, epidemiologic and economic studies on bovine tuberculosis in humans and livestock will contribute to define an adapted control program for zoonotic disease.

Keywords: Chad, zoonosis, *Mycobacterium bovis*, culture, spoligotyping, VNTR.



* Texte de la communication présentée à la Journée AEEMA, 20 mai 2005

¹ Institut tropical Suisse, Socinstrasse 57, Boîte Postale, 4002 Bâle, Suisse

² Laboratoire de recherches vétérinaires et zootechniques de Farcha, Boîte Postale 433, N'Djaména, Tchad

³ Centre national des mycobactéries, Institut de microbiologie médicale, Université de Zurich, Gloriastrasse 30/32, 8028 Zurich, Suisse

I - INTRODUCTION

Au Tchad, en Afrique Centrale, l'existence de la tuberculose bovine a été suspectée par les tests de tuberculination sur bovins et par l'abattoir. Le diagnostic de laboratoire ne se résume qu'à la microscopie, alors que cette méthode ne permet pas de différencier les espèces de mycobactéries, et encore moins les isolats du complexe *Mycobacterium tuberculosis* qui comprend *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* et *M. canettii*. Sachant que la tuberculose bovine causée par *M. bovis* est une zoonose, le rôle attribué à *M. bovis* dans les cas de tuberculose humaine en Afrique reste mal défini et encore moins chez les patients co-infectés par le VIH [Cosivi *et al.*, 1998]. Il manque communément des études épidémiologiques et des preuves bactériologiques. *M. bovis* se transmet de l'animal à l'homme par ingestion du lait cru et de la viande contaminée ou par aérosol. Une infection par *M. bovis* cause souvent des tuberculoses extra-pulmonaires surtout chez les enfants [Dankner et Davis, 2000]. Pourtant, la tuberculose chez l'homme due à *M. bovis* est cliniquement indissociable de celle à *M. tuberculosis*. La preuve d'une origine bovine de l'affection ne peut se faire que par le biais d'une étude microbiologique.

Dans la majorité des pays africains aucune mesure n'est appliquée en vue d'estimer la prévalence de l'infection et d'éliminer la maladie du cheptel. Cette situation de l'Afrique aujourd'hui correspond à celle qui prévalait en Europe avant l'instauration de la pasteurisation du lait et l'éradication de la maladie par élimination des réacteurs détectés dans les élevages [Pritchard, 1988].

Des nouvelles méthodes moléculaires permettent de déterminer l'importance et les facteurs influençant la transmission de la tuberculose entre les bovins. La méthode utilisée le plus souvent pour ce typage moléculaire des souches du complexe *M. tuberculosis* (CMT) est l'analyse de la séquence d'insertion 6110: « Insertion Sequence 6110 Restriction Fragment Length Polymorphism » (IS6110 RFLP). Cependant, cette méthode n'est pas en mesure de différencier des souches à faible nombre de copies d'IS6110 - comme c'est le cas pour *M. bovis* [Kremer *et al.*, 1999]. Le spoligotypage

(« spacer oligonucleotide typing ») repose sur la détection des séquences spacers polymorphes de la région DR (Direct Repeat). La région DR fait partie des séquences courtes répétées. Le spoligotypage avec l'examen de la présence ou non de 43 spacers est plus discriminant que le RFLP IS6110 pour le typage des souches ayant moins de cinq copies IS6110. En plus, cette méthode se base sur le test PCR et de cette façon ne demande pas beaucoup de matériel à partir des cultures. Elle permet une classification fiable des souches du CMT [Kamerbeek *et al.*, 1997]. La méthode de typage la plus récente est le typage des séquences répétées en nombre variable « Variable Numbers of Tandem Repeats » (VNTRs). Les séquences amplifiées par PCR incluent des « Exact Tandem Repeats » (ETRs) [Frothingham et Meeker-O'Connell, 1998], des « Mycobacterial Interspersed Repetitive Units » (MIRUs) [Mazars *et al.*, 2001a; Supply *et al.*, 2000] et deux séries de VNTRs identifiées par l'Université à Belfast : Queen's University Belfast [Roring *et al.*, 2002 ; Skuce *et al.*, 2002]. Vu que les résultats sur le polymorphisme des loci des souches du CMT varient d'un pays à l'autre, une standardisation de la méthode du typage des VNTRs, qui est généralement plus discriminante que le spoligotypage, serait indispensable pour mieux comparer les différentes études.

Dans le cadre d'une étude sur les zoonoses chez les pasteurs nomades du Chari-Baguirmi au Tchad, un laboratoire de culture de mycobactéries humaines et animales a été mis en place au Laboratoire de recherches vétérinaires et zootechniques de Farcha (LRVZ/F). Les objectifs décrits dans ce manuscrit ont été l'isolement de souches mycobactériennes à partir d'échantillons chez les zébus Mbororos et Arabes, la caractérisation des souches isolées par des méthodes biochimiques et moléculaires, la comparaison des isolats du Tchad avec ceux des pays limitrophes, la détermination du pouvoir discriminant des différentes méthodes moléculaires dans le contexte du typage des isolats de mycobactéries tuberculeuses chez les bovidés au Tchad.

II - MÉTHODOLOGIE

1. ECHANTILLONNAGE

La taille du cheptel bovin au Tchad a été estimée à 5 595 000 en 2000. Ce sont des zébus (*Bos indicus*) Arabes, Peuls, Mbororos, et Toupouris ainsi qu'une race taurine (*Bos taurus*), les bovins Kouris. A l'abattoir de Farcha (Société moderne des abattoirs de Farcha) dans la capitale N'Djaména, parmi les 50 000 bovins qui sont abattus chaque année approximativement 90% sont des Arabes, 7% des Mbororos et 3% des Kouris [Ministère de l'Elevage, 2003]. Des biopsies d'organes ont été réalisées entre 2000 et 2002 à l'abattoir sur les carcasses d'animaux saisies pour cause de tuberculose y compris des dromadaires. Tous les prélèvements ont été transportés sous glace au LRVZ/F.

En juillet et août 2002, 10 000 bovins entrant à l'abattoir (7 397 zébus Arabes, 2 596 zébus Mbororos et 7 Kours) ont été évalués par rapport à la saisie pour tuberculose [Doutoum et Toko, 2002]. Parmi les 727 carcasses/10 000 qui ont été saisies pour cause de tuberculose, 199 carcasses ont été échantillonnées (nodules lymphatiques, poumons et foie) et les informations sur la race, le sexe, la nature de la saisie (totale ou partielle) ont été collectées.

2. CULTURES DES MYCOBACTERIES

Les échantillons ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée. Les prélèvements des organes ont été coupés dans 5 à 6 pièces, puis homogénéisés dans des sachets stériles contenant 15 ml de 0,85% NaCl en solution à l'aide du broyeur de type STOMACHER 80 (Seward Laboratory Systems, Bristol, U.K.) pendant une minute et à trois reprises. Dix millilitres de la suspension du broyat ont été décontaminés par la méthode N-Acetyl-L-Cystéine (0,5%NALC)- 2%NaOH [Kent et Kubica, 1985] puisensemencés sur trois milieux. Les milieux utilisés ont été le milieu de Löwenstein-Jensen avec 0,75% de glycérine, le milieu de Löwenstein-Jensen avec 0,6% de pyruvate et sans glycérine et le milieu liquide à base de Middlebrook 7H9 additionné d'OADC et de PANTA. Les cultures ont été incubées à 37°C sans apport en CO₂. Elles ont été bien aérées et ont eu un temps d'incubation de 8 semaines avant de les déclarer négatives. La

lecture se faisait une fois par semaine. Un frottis sur lame a été confectionné avec une goutte du sédiment après décontamination des suspensions homogénéisées pour la recherche des bacilles alcool-acido-résistants (BAAR) en examen direct.

Dès l'apparition de colonies sur les milieux solides ou bien d'une croissance en milieu liquide, un passage a été effectué sur trois tubes de milieu Löwenstein-Jensen. Trois tests biochimiques (réduction des nitrates, accumulation de la niacine et l'activité catalasique thermolabile à 68°C) [Kent et Kubica, 1985] ont été effectués pour l'identification des mycobactéries et pour différencier les souches du complexe *M. tuberculosis* (CMT) des souches n'appartient pas à ce contexte. La PCR en temps réel a été utilisée pour confirmer l'appartenance des isolements au CMT [Kraus *et al.*, 2001].

3. TYPAGE MOLECULAIRE ET DIVERSITE ALLELIQUE

Le spoligotypage [Kamerbeek *et al.*, 1997] a été effectué au Centre national des mycobactéries à Zurich et répété au Veterinary laboratories agency à Weybridge en Angleterre. La technique de typage des VNTRs comprenait les étapes suivantes: i) le mélange réactionnel pour tous les loci était composé de 1x *Taq* tampon PCR (0,2 mM), des 4 deoxynucleoside triphosphates (0,2 mM), d'1 U d'Ampli^{Taq} Gold DNA polymérase (Perkin-Elmer Applied Biosystems), de 0,5 µM de chaque amorce et de l'ADN mycobactérien dans un volume final de 20 µl. Les amorces de 12 MIRUs, de 3 ETRs et du VNTR3232 ont été utilisées [Frothingham et Meeker-O'Connell, 1998; Roring *et al.*, 2002; Cowan *et al.*, 2002a]; ii) la réaction dans un Perkin-Elmer 9600 a commencé par une dénaturation pendant 10 minutes à 95°C et a été complétée par une incubation pendant 10 minutes à 72°C; iii) l'amplification (PCR) comporte 40 cycles de 0,5 minutes à 94°C, 0,5 minutes à 65°C et une minute à 72°C; iv) les produits de la PCR ont été analysés par une électrophorèse en gel d'agarose (2% NuSieve agarose). La taille des amplicons a été déterminée à l'aide du « Size Marker VIII » (Roche).

La diversité allélique (h) des VNTRs (individuellement pour les MIRUS, ETRs et pour les diverses combinaisons) a été calculée avec l'équation suivante:

$$h = 1 - \sum x_i^2 / [n/(n-1)],$$

n est le nombre d'isolements et

x_i la fréquence de l'allèle i sur le locus [Selander *et al.*, 1986].

Nous avons considéré sur la base de la répartition de nos valeurs obtenues un $h > 0,25$ comme hautement discriminant, $0,11 < h < 0,25$ modérément et $0,01 < h < 0,11$ comme peu discriminant. Les diversités alléliques calculées ont été comparées avec celles obtenues dans une étude faite en Irlande du Nord [Roring *et al.*, 2004].

4. ANALYSES STATISTIQUES

Le test de khi-carré a été utilisé pour rechercher l'existence d'une association statistique entre la race et le type de saisie à l'abattoir ou la culture. Pour les relations entre les groupes d'isolats et la race, le test exact de Fisher a été utilisé. Un modèle de régression multivariée avec la variable dépendante de l'isolement de *M. bovis* a été ajusté aux co-variables (saisie, sexe, race, origine de l'animal). Les analyses de groupement ont été faites avec SAS Version 8.02 Proc cluster (USA Statistical Analysis Systems Inc., Cary, NC).

III - RÉSULTATS

En 2002, la prévalence de lésions tuberculeuses à l'abattoir était de 7,3%. Une proportion de lésions plus élevée a été trouvée chez les carcasses de race Mbororo par rapport à la race zébu Arabe ($p=0,04$). A l'abattoir et dans l'échantillon de 199 animaux, la saisie totale en comparaison à la saisie partielle a été plus souvent effectuée chez les bovins Mbororos que chez les Arabes ($p \leq 0,001$ et $p = 0,002$) (tableau I). La culture et les tests biochimiques ont identifié 58 souches du CMT et 26 souches de mycobactéries non agents de tuberculose (MNT). Cinquante cinq

souches CMT ont été confirmées comme appartenant à l'espèce *M. bovis* par spoligotypage et une souche n'a pas pu être caractérisée par spoligotypage. Au moins un isolement de *M. bovis* a été obtenu chez un quart des échantillons et à partir de 42% des cultures positives. De manière statistiquement significative ($p = 0.004$), *M. bovis* a été plus souvent isolé chez les zébus Mbororos par rapport aux Arabes (tableau I). Cette différence était aussi significative dans le modèle de régression logistique ajusté au type de saisie et à l'origine de l'animal.

Tableau I

Association entre la race et le type de saisie ainsi que le résultat de la culture

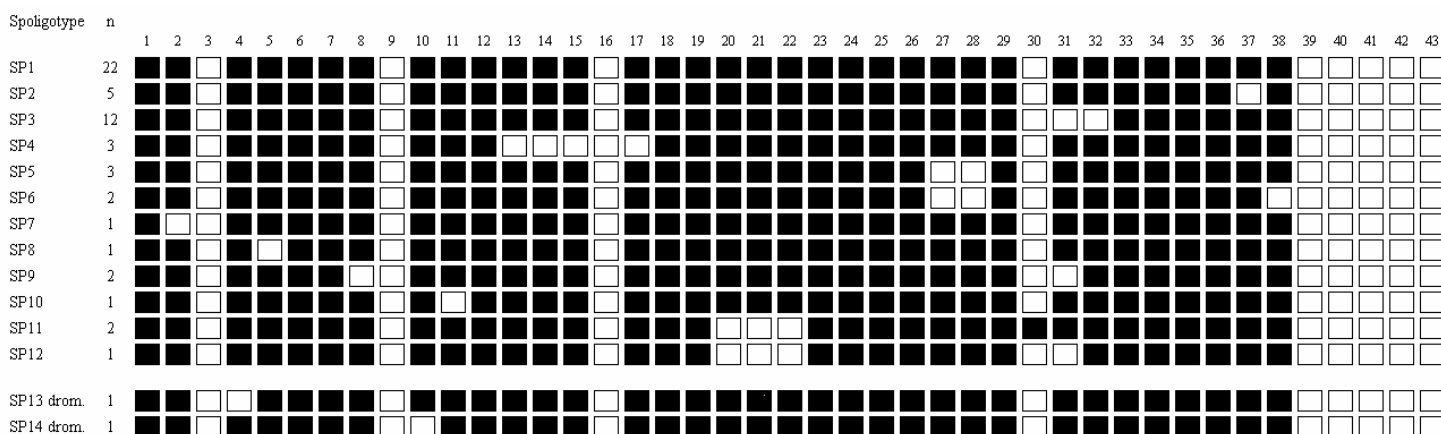
	Race zébu		p
	Arabe n=124	Mbororo n=75	
Saisie partielle	113	56	
Saisie totale	11	19	0,002
MNT* ou négative	98	45	
<i>M. bovis</i>	26	30	0,004

* MNT : mycobactéries non tuberculeuses

Parmi les 55 souches isolées chez les bovins en 2002, douze différents profils en spoligotypage ont été obtenus. Seulement quatre profils ont été uniques et huit profils ont été rassemblés en groupes avec deux à 22 souches par groupe. Chez tous les isolats, il a été noté l'absence des spacers 3, 9, 16, et 39-43, ce qui est caractéristique pour *M. bovis*. En

plus, 53/55 souches ne possédaient pas le spacer 30 (figure 1). La répartition des races pour les différents groupes a été significativement différente ($p \leq 0,01$). Nous avons aussi étudié deux isolats uniques qui ont été isolés chez les dromadaires en 2002 (SP13 et SP14, figure 1).

Figure 1
Profils en spoligotypie obtenus avec 55 souches de *M. bovis* du Tchad



Les tests d'hybridation, de spoligotypage et la technique de typage des VNTRs ont été réalisés avec 67 isolats de *M. bovis* du Tchad isolés entre 2000 et 2002. Les produits d'amplification obtenus ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose et le nombre des copies a été déterminé. La diversité allélique (h) des 16 loci VNTR (12 MIRUs, 3 ETRs et VNTR 3232) a varié entre 0 et 0,74. Cinq loci (ETR A, B, C et MIRU 26, 27) ont été hautement discriminants ($h > 0,25$); deux loci (MIRU 4 et VNTR 3232) modérément ($0,11 < h < 0,25$) et trois loci (MIRU 16, 20, 31) peu ($0,01 < h < 0,11$) discriminants (tableau II). Les diversités calculées ont été comparées avec celles obtenues dans une étude en Irlande du Nord [Roring *et al.*, 2004].

Parmi les 67 souches de *M. bovis* du Tchad, avec le spoligotypage 90% des souches ont été associées en groupes et la diversité allélique (h) était de 0,79. Les douze MIRUs ont donné 18 profils différents ($h = 0,75$) et ont regroupé 30 souches dans un même groupe. Les trois ETRs ont fourni 22 profils différents avec une haute diversité allélique de 0,91. La combinaison des profils obtenus par spoligotypage et des différents profils VNTRs (MIRUs et ETRs) a augmenté la diversité de 0,92 à 0,94 (tableau III). La combinaison des ETRs et des deux MIRUs les plus discriminants (MIRU 26 et 27) a permis d'obtenir une diversité allélique de 0,917 et nous considérons ceci comme suffisamment discriminant pour une étude épidémiologique initiale.

Tableau II

**Diversité allélique de 67 isolats du Tchad pour 16 loci et comparaison
avec les résultats obtenus dans une étude menée en Irlande du Nord.**

a : les loci MIRU 2 et 3232 n'ont pas pu être amplifiés pour une souche.
MIRU 4 (b) et MIRU 31 (c) correspondent à ETR D et ETR E.

No. de copies	MIRU												ETR			Locus 3232 ^a
	2 ^a	4 ^b	10	16	20	23	24	26	27	31 ^c	39	40	A	B	C	
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	4	-	-	1	-	-	2	7	-	-	-	-	-	-	-
2	66	1	67	3	66	-	67	1	11	2	67	67	1	-	-	-
3	-	60	-	63	-	-	-	2	49	64	-	-	7	12	6	-
4	-	2	-	1	-	67	-	2	-	1	-	-	48	3	14	-
5	-	-	-	-	-	-	-	55	-	-	-	-	7	25	41	-
6	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	1	16	5	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	1	3
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	60
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Diversité allélique de 67 souches de <i>M.</i> <i>bovis</i> du Tchad	0	0,18	0	0,10	0,02	0	0	0,30	0,41	0,07	0	0	0,45	0,74	0,55	0,16
47 souches de <i>M.</i> <i>bovis</i> de l'Irlande du Nord	0	0	0	0,02	0	0	0,37	0,52	0	0	0,06	0,27	0,40	0,37	0	0,60

Tableau III
Diversité allélique obtenue avec différentes méthodes de typage génétique

Méthode	Diversité allélique	Profils des 67 isolats de <i>M. bovis</i>											
		Isolats uniques	Tailles des groupes avec des isolats ayant le même profil										
			2	3	4	5	6	7	11	12	13	26	30
Spoligotypage	0,789	7	4	2	-	-	-	1	-	-	1	1	-
MIRUs	0,754	11	3	1	-	-	1	-	1	-	-	-	1
ETRs	0,906	9	5	4	-	-	1	1	1	1	-	-	-
MIRUs et ETRs (tous les VNTRs)	0,922	22	6	2	1	-	-	-	1	1	-	-	-
Tout combiné	0,944	27	5	3	1	-	1	-	1	-	-	-	-

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Une étude menée à l'abattoir en 1963 [Perpezat, 1963] a proposé que plutôt que le farcin (causé par *Nocardia farcinogenes*, renommé *Mycobacterium farcinogenes*), la tuberculose bovine était importante chez les zébus tchadiens. Nous décrivons ici les caractéristiques des premières souches mycobactériennes isolées chez le bétail au Tchad. D'une part, les isolements de *M. bovis* ont confirmé la présence de la tuberculose bovine au Tchad. D'autre part, la caractérisation des mycobactéries non agents de tuberculose a permis d'identifier trois isolats de *Mycobacterium fortuitum* 3rd variant. Ce résultat confirme la présence du farcin chez le cheptel tchadien parce que *M. fortuitum* 3rd variant est étroitement lié à *M. farcinogenes* [Turenne *et al.*, 2001].

L'isolement de *M. bovis* chez l'homme est relativement rare au vu des travaux effectués en Afrique [Kazwala *et al.*, 2001; Cosivi *et al.*, 1998] ; cela peut s'expliquer par le fait que les laboratoires dans les pays en développement et plus particulièrement en Afrique concentrent leur effort sur l'isolement de *M. tuberculosis*, sachant que certaines conditions favorables à *M. tuberculosis* sont défavorables à l'isolement de *M. bovis* (par ex: présence de la glycérine dans le milieu de culture). Au Tchad, en parallèle avec l'étude à l'abattoir, des prélèvements (crachats et urines) ont été collectés chez les tuberculeux à l'hôpital général de N'Djaména. Nous avons obtenu 35

isolats de *M. tuberculosis*, mais aucune souche bovine.

Lors d'études de tuberculination chez les bovins, les animaux à réponse positive ont été plus fréquents chez les zébus Mbororos que chez les zébus Arabes ($p = 0,02$) [Schelling *et al.*, 2000]. Une sensibilité élevée des zébus Mbororos à la tuberculose a été aussi attestée lors d'études à l'abattoir. Les zébus Mbororos avaient plus souvent une tuberculose généralisée par rapport aux zébus Arabes et ceci a été reflété par un taux de saisies totales plus élevé chez les Mbororos. Une sensibilité élevée des bovins Mbororos à la tuberculose a aussi été observée au Cameroun [Nfi et Ndi, 1997]. Il serait intéressant de mieux explorer la base immunologique de cette sensibilité, car ceci pourrait apporter de nouvelles idées pour le développement d'un vaccin plus efficace pour le bétail.

Le spoligotypage a surtout été utilisé pour le diagnostic. Cependant, cette méthode a aussi fourni des résultats épidémiologiques sur *M. bovis* malgré ses limites pour l'épidémiologie moléculaire [Zumarraga *et al.*, 1999]. Certains profils ont été distincts selon les races de zébus, mais pas par rapport au type de saisie. Le taux d'isolats groupés (>90% pour le spoligotypage et un niveau élevé [60%] pour toutes les méthodes moléculaires combinées) indique une transmission récente importante des souches identiques. Une prévalence de 7% à l'abattoir souligne cette interprétation. Haddad *et al.* [2001] ont interprété la

répartition des profils des souches bovines isolées en France selon l'hypothèse utilisée pour l'analyse de *M. tuberculosis* chez l'homme et qui a été confirmée avec plusieurs études : dans une situation de haute prévalence et incidence, une souche dominante tend à exclure les autres ; par contre, dans un contexte de basse prévalence, les types de souches apparaissent proportionnellement. Par rapport à *M. bovis*, cette hypothèse n'a pas encore été validée car l'outil moléculaire le plus répandu (l'IS6110 RFLP) n'était pas performant pour différencier les souches *M. bovis*. Le taux d'isolats groupés dépend aussi de l'échantillonnage, s'il est représentatif ou non pour une population donnée. Un échantillon non représentatif souvent sous-estime la proportion réelle des souches identiques [Vynnycky *et al.*, 2003]. Dans notre cas, l'échantillon n'était pas représentatif pour une zone précise au Tchad - l'origine géographique des animaux n'était pas connue - donc le taux d'isolats groupés pourrait même être plus élevé.

En effet dans un contexte sans contrôle de la tuberculose bovine comme au Tchad, une souche pourrait devenir dominante. Lors des mesures de lutte et suite à une réduction importante de la prévalence, le taux d'isolats groupés devrait diminuer en parallèle. Pour le Cameroun, il a été supposé qu'une souche semblable à la souche BCG a été introduite dans le passé. Cette souche a perdu le spacer DR 30 ce qui aurait pu être lié à une meilleure adaptation à l'environnement camerounais et lui permettait de se propager rapidement. Certaines grappes Camerounaises ont uniquement été détectées au Sud du Cameroun et pas au Nord. Apparemment, les mesures gouvernementales pour limiter les mouvements du bétail entre le Sud et le Nord du Cameroun ont été effectives [Njanpop-Lafourcade *et al.*, 2001]. Les souches du Tchad, à l'exception de la SP11, étaient dépourvues de DR 30 comme la plupart des souches bovines décrites au Cameroun. Le profil dominant au Tchad (SP1, 40%) était le même que celui trouvé au Cameroun. Deux autres profils dans notre étude ont été aussi décrits pour le Nord du Cameroun, qui fait frontière avec le Tchad. Dans la zone Sahélienne du Tchad, trois quart des troupeaux sont gardés dans un système d'élevage mobile [Ministère de l'Élevage, 1998]. La transhumance des éleveurs avec leur bétail entre le Tchad et le Cameroun, ainsi qu'entre le Tchad et la Nigeria ou le Niger, est peu contrôlée par les services vétérinaires par manque d'infrastructure dans ces zones éloignées. Nos résultats démontrent un

échange transfrontalier de souches mycobactériennes entre le Tchad et le Cameroun. Des publications sur des souches isolées dans les autres pays limitrophes ne sont pas encore disponibles. Cependant, nous attendons que de telles études mettent en évidence des souches identiques dans les pays formant le bassin du Lac Tchad.

Les douze loci MIRUs déjà utilisés pour l'étude du polymorphisme de *M. bovis* et de *M. tuberculosis* en France, en Afrique du Sud et aux Etats Unis [Savine *et al.*, 2002; Mazars *et al.*, 2001b; Cowan *et al.*, 2002b], ont été utilisés dans le cadre du projet. Cependant, le taux d'isolats groupés était de 84%. Parce que ce résultat n'était pas satisfaisant, le pouvoir discriminant des trois ETRs (A, B et C) et du locus VNTR 3232 a été testé. Les 3 ETRs se sont avérés plus discriminants. En considérant l'étude menée en Irlande du Nord [Roring *et al.*, 2004], les ETR A et B, MIRU 26 et VNTR 3232 semblent être appropriés comme outil de typage moléculaire dans les deux pays. Il reste à définir la combinaison de VNTRs qui serait la meilleure à l'échelle de plusieurs contextes et pays. Une série de VNTRs est idéalement composée de peu de loci (c'est-à-dire <10) si on souhaite assurer le typage de souches de *M. bovis* de façon économique et sans nécessiter un travail excessif.

Pour les souches tchadiennes, nous considérons les loci les plus discriminants (MIRUs 26, 27 et ETRs A, B, C) adéquats pour une première différenciation. Ceci demande une amplification des cinq loci par PCR et une électrophorèse en gel d'agarose pour séparer et visualiser les produits polymorphes (ou non). Une telle approche ne demande pas d'appareillage très sophistiqué. Afin de faciliter la comparaison avec d'autres isolats et pour augmenter la puissance discriminante, tous les loci polymorphes et les résultats du spoligotypage devront être considérés. Un tel typage pourrait contribuer à un suivi plus approfondi des mouvements transfrontaliers des bovins et à identifier les facteurs de risque d'une transmission récente entre les bovins. En plus, les contaminations croisées au laboratoire pourraient être déterminées plus spécifiquement.

Vu que la prévalence de la tuberculose bovine à l'abattoir de N'Djaména est élevée, il y a un risque d'exposition de l'homme à cette zoonose. Avec la résurgence du VIH, la transmission des mycobactéries non agents de tuberculose a pareillement éveillé davantage d'intérêt. La symptomatologie de ces mycobactérioses n'est généralement pas différente de celle de la tuberculose classique,

mais leur traitement est souvent compliqué par leur résistance élevée aux médicaments antituberculeux [Schutt-Gerowitz, 1995]. La tuberculose à *M. bovis* a aussi des implications sur le schéma de traitement parce que cette espèce est naturellement résistante à la pyrazinamide.

La situation économique des pays en voie de développement ne permet pas l'application des mêmes mesures de contrôles que celles utilisées dans les pays industrialisés. Les contraintes majeures d'une lutte efficace contre la tuberculose bovine en Afrique sont : i) une absence notoire des laboratoires de culture; ii) un manque de ressources pour compenser financièrement l'élimination des animaux ; iii) des systèmes de surveillance inadéquats, une absence de programmes nationaux de contrôle et une communication inexistante entre les secteurs; iv) des mesures hygiéniques insuffisantes dans la filière laitière informelle; v) les consommateurs ne connaissent pas les risques d'une transmission de zoonose des produits animaux à l'homme. Les analyses économiques peuvent contribuer à l'identification des mesures ayant un rapport

coût/efficacité plus satisfaisant dans un certain contexte. Une telle analyse doit inclure les coûts et les bénéfices réalisés dans le secteur vétérinaire et en santé publique, mais aussi dans d'autres secteurs comme le commerce.

Dans le but de limiter la propagation de la tuberculose humaine et animale, la surveillance systématique dans les abattoirs doit être renforcée et l'origine des porteurs de lésions déterminée afin d'identifier les zones et les élevages infectés. Cette étude a contribué à identifier les méthodes moléculaires appropriées pour la caractérisation des souches *M. bovis* du Tchad et recommande qu'une meilleure combinaison de VNTRs au point de vue du pouvoir discriminant soit définie pour chaque contexte. Des études en épidémiologie moléculaire avec ces nouvelles techniques permettront de décrire la transmission transfrontalière et fourniront les données de base sur la répartition géographique des mycobactéries de la tuberculose bovine. De telles données faciliteraient le suivi de l'efficacité des mesures de contrôle qui seraient entreprises.

BIBLIOGRAPHIE

- Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D. *et al.* - Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases*, 1998, **4**, 59-70.
- Cowan L.S., Mosher L., Diem L., Massey J.P., et Crawford J.T. - Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.*, 2002a, **40**, 1592-602.
- Cowan L.S., Mosher L., Diem L., Massey J.P., et Crawford J.T. - Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.*, 2002b, **40**, 1592-1602.
- Dankner W.M. et Davis C.E. - *Mycobacterium bovis* as a Significant Cause of Tuberculosis in Children Residing Along the United States - Mexico Border in the Baja California Region. *Pediatrics*, 2000, **105**.
- Doutoum A.M. et Toko M.A. - Mycobactérioses bovines et saisies à l'abattoir de Farcha. 2002. Institut Universitaire des Sciences et Techniques d'Abéché (IUSTA).
- Frothingham R. et Meeker-O'Connell W.A. - Genetic diversity in the complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 1998, **144** (Pt 5 *Mycobacterium tuberculosis*), 1189-1196.
- Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Masselot M., Thorel M.F., Hughes S.L. *et al.* - Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3623-3632.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., Van Agterveld M., Van Soolingen D., Kuijper S. *et al.* - Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, **35**, 907-914.

- Kazwala R.R., Daborn C.J., Sharp J.M., Kambarage D.M., Jiwa S.F., et Mbembati N.A. - Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2001, **5**, 87-91.
- Kent P.T. et Kubica G.P. - Public health mycobacteriology - a guide for the level III laboratory, 1985, U.S. Department of health and human Services publication, Atlanta.
- Kraus G., Cleary T., Miller N., Seivright R., Young A.K., Spruill G., et Hnatyszyn H.J. - Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol. Cell Probes*, 2001, **15**, 375-383.
- Kremer K., Van Soolingen D., Frothingham R., Haas W.H., Hermans P.W., Martin C. *et al.* - Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.*, 1999, **37**, 2607-18.
- Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Gicquel B. *et al.* - High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2001a, **98**, 1901-6.
- Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Gicquel B. *et al.* - High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001b, **98**, 1901-1906.
- Ministère de l'Élevage - Reflexion prospective sur l'élevage au Tchad, 1998, Tchad, Ministère de l'Élevage.
- Ministère de l'Élevage - Rapport national sur les ressources zoogénétiques du Tchad. 1-196. 2003. N'Djaména, Tchad, Ministère de l'Élevage.
- Nfi A.N. et Ndi C. - Bovine tuberculosis at the Animal Research Antenna (ARZ) Bangangte, Western province, Cameroon. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.*, 1997, **45**, 1-3.
- Njanpop-Lafourcade B.M., Inwald J., Ostyn A., Durand B., Hughes S., Thorel M.F. *et al.* - Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 222-227.
- Perpezat A. - Importance du farcin chez le zébu du Tchad. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1963, **56**, 375-383.
- Pritchard D.G. - A Century of Bovine Tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *Journal of Comparative Pathology*, 1988, **99**, 357-388.
- Roring S., Scott A., Brittain D., Walker I., Hewinson G., Neill S., et Skuce R. - Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 2126-2133.
- Roring S., Scott A.N., Glyn H.R., Neill S.D., et Skuce R.A. - Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol.*, 2004, **101**, 65-73.
- Savine E., Warren R.M., van der Spuy G.D., Beyers N., van Helden P.D., Loch C., et Supply P. - Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 4561-4566.
- Schelling E., Diguimbaye C., Daoud S., Daugla D.M., Bidjeh K., Tanner M., et Zinsstag J. - La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis* : résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades Foulbés et Arabes dans le Chari-Baguirmi au Tchad. *Sermpervira*, 2000, **8**, 44-55.
- Schutt-Gerowitz H. - On the development of mycobacterial infections. I. A review concerning the common situation. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1995, **283**, 5-13.
- Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., et Whittam T.S. - Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **51**, 873-884.
- Skuce R.A., McCorry T.P., McCarroll J.F., Roring S.M., Scott A.N., Brittain D. *et al.* - Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, 2002, **148**, 519-528.

Supply P., Mazars E., Lesjean S., Vincent V., Gicquel B., et Locht C. - Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.*, 2000, **36**, 762-71.

Turenne C.Y., Tschetter L., Wolfe J., et Kabani A. - Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 3637-3648.

Vynnycky E., Borgdorff M.W., Van Soolingen D., et Fine P.E. - Annual *Mycobacterium tuberculosis* Infection Risk and Interpretation of Clustering Statistics. *Emerg Infect Dis.*, 2003, **9**, 176-83.

Zumarraga M.J., Martin C., Samper S., Alito A., Latini O., Bigi F. *et al.* - Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South America. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 296-303.

