

## COMPARAISON DES SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* ISOLÉES EN FRANCE EN ÉLEVAGE ET DANS LA FAUNE SAUVAGE GRÂCE AUX TECHNIQUES D'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE \*

Amandine Hauer<sup>1,2</sup>, Thierry Cochard<sup>1</sup>, Krystel De Cruz<sup>2</sup>, Claudine Karoui<sup>2</sup>, Sylvie Hénault<sup>2</sup>,  
Franck Biet<sup>1</sup> et Maria-Laura Boschioli<sup>2</sup>

### RÉSUMÉ

Le génotypage de souches de *Mycobacterium bovis*, la bactérie responsable de la tuberculose chez les mammifères, apporte des données précieuses en permettant d'étudier la dynamique de cette zoonose et de mieux comprendre sa nature complexe. Les génotypes de la collection complète de souches, provenant d'animaux sauvages et de rente, de *M. bovis* françaises, répertoriées de 1978 à 2011, ont été obtenus par spoligotypage et typage VNTR. Des fluctuations dans la variabilité génétique du bacille au cours du temps et en fonction de la zone géographique étudiée ont été constatées, avec une diminution de la diversité génétique des souches ces dix dernières années. Cependant certaines souches persistent au cours du temps et sont réparties sur l'ensemble du territoire. Trois types de souches représentent plus de 50 % de la totalité des *M. bovis* françaises : SB0120, SB0134 et la famille F4. Leur typage VNTR permet de mettre en lumière leur grande diversité et la forte régionalisation de certains types. Par ailleurs, la connaissance approfondie du génotype a permis d'identifier des souches régionalisées infectant de manière indifférenciée aussi bien la faune sauvage que les animaux de rente. Ce constat prouve la capacité des souches à proliférer au sein d'un système multi-hôtes.

En conclusion, les outils de caractérisation moléculaire de la tuberculose bovine sont d'une très grande utilité pour compléter les approches épidémiologiques conventionnelles. Ils permettent d'améliorer le suivi des foyers, d'orienter la mise en place de nouveaux schémas de surveillance mais également d'évaluer l'efficacité des programmes de contrôle.

**Mots-clés :** tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, spoligotypage, typage VNTR, France, épidémiologie moléculaire.

### SUMMARY

Genotyping of *Mycobacterium bovis* strains, responsible of the tuberculosis in mammals, provides valuable information for studying dynamics of this zoonotic disease and better understanding its complexity. In France, the total collection of animal *M. bovis* strains, from wildlife and livestock, identified from 1978 to 2011, were genotyped by spoligotyping and VNTR typing. Fluctuations in genetic variability, depending on time and geographical localization, were observed with a decrease in the genetic diversity during the past 10 years. However, some strains which are widespread in the whole French territory tend to persist. Three of them, represent more than 50% of the global strains identified: SB0120, SB0134 and the F4-family. VNTR typing is very useful for highlighting their important genotypic diversity and strong regionalization of some strains. Besides, a better genotyping characterization had shown that the same type of strains can be identified both in wildlife and cattle.

.../..

\* Texte de la conférence présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA-RFSA, 18 mars 2014

<sup>1</sup> INRA, UMR1282, Infectiologie et santé publique (ISP-311), F-37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup> ANSES, Laboratoire national de référence (LNR), Unité zoonoses bactériennes (UZB), 94706 Maisons-Alfort, France

.../..

This observation proves the existence of multi-host *M. bovis* transmission systems. To conclude, molecular characterization tools in bovine tuberculosis have an important role to complete classical epidemiologic surveys. They permit to improve outbreak investigations, to implement new surveillance schemes, and to evaluate the efficacy of national control programs.

**Keywords:** Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, Spoligotyping, VNTR typing, France, Molecular epidemiology.




---

## I - INTRODUCTION

---

La tuberculose bovine (bTB) est une infection zoonotique, due à *Mycobacterium bovis*, une bactérie pouvant infecter toutes les espèces mammifères mais dont les bovins sont considérés, en France, comme le réservoir principal. Il existe de nombreux types de souches de *M. bovis* sur notre territoire qui sont actuellement identifiées grâce à des techniques d'épidémiologie moléculaire. L'identification de ces différentes bactéries repose sur deux techniques : le spoligotyping et le typage VNTR (Variable Number Tandem of Repeat)

[Boulouis *et al.*, 2001 ; Haddad *et al.*, 2004]. Le génotypage des souches de *M. bovis* apporte des données précieuses pour la réalisation d'études épidémiologiques qui permettent de mieux comprendre la nature complexe de l'infection.

L'objectif de cette étude est de décrire l'évolution de la population de souches de *M. bovis* en France, de 1978 à 2011, grâce à l'épidémiologie moléculaire, afin d'essayer d'expliquer l'évolution actuelle de la maladie notamment dans les régions où elle semble persister.

---

## II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

### 1. SOUCHES

Les souches étudiées ont été isolées en France à partir de cas d'animaux infectés répertoriés au Laboratoire national de référence tuberculose (LNR, UZB, ANSES, Maisons-Alfort) de 1978 à 2011 [Haddad *et al.*, 2001]. Sur l'ensemble du territoire français, 3224 souches de *M. bovis* ont été isolées à partir de différentes espèces animales. Dans cette collection, 86 % des souches ont été isolées de bovins, 10 % d'espèces appartenant à la faune sauvage (cerfs, chevreuils, sangliers, blaireaux, renards), 2 % à partir d'animaux de rente autre que des bovins et 2 % d'autres animaux (carnivores domestiques, animaux de zoo, ...).

### 2. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE

#### 2.1. SPOLIGOTYPAGE

De 1978 à 2011, 3 142 souches ont été spoligotypées en utilisant le protocole développé par Kamberbeek *et al.* [1995] et adapté par notre laboratoire pour la méthode Luminex [Zhang *et al.*, 2010]. Le procédé est basé sur la détection de 43 «spacers» présents dans la région génomique de «Direct Repeat» (DR). Un code binaire à 43 entrées est obtenu, suivant leur présence ou leur absence, correspondant au type de la bactérie. Le profil obtenu est caractérisé sur la base du répertoire international *Mbovis.org*.

## 2.2. TYPAGE-VNTR

Le typage VNTR utilise l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des locus contenant un nombre variable de répétitions [Frothingham *et al.*, 1998 ; Skuce *et al.*, 2002 ; Roring *et al.*, 2002]. L'analyse est fondée sur 8 locus : ETR A, ETR B, ETR D, QUB 11a, QUB 11b, QUB 3232 choisis par le consortium Européen VenoMYC, et ETR C et QUB

26, choisis en fonction des données françaises. Pour chaque souche de *M. bovis*, le résultat est donné sous forme d'une chaîne de caractères à huit chiffres, qui définissent le profil de la souche. L'identification VNTR de 1986 souches a été faite par Genoscreen (Lille, France), sur au moins deux souches par an par cheptel du même spoligotype.

## III - RÉSULTATS

### 1. ANALYSE DE L'ENSEMBLE DES SPOLIGOTYPES PRÉSENTS EN FRANCE (1978-2011)

Cette étude rétrospective des 30 dernières années a été divisée en trois périodes: 1978-1990 ; 1991-2000 ; 2001-2011. De 1978 à 2000, la répartition géographique des souches de *M. bovis* était globale sur l'ensemble du territoire. Dans la deuxième et la troisième périodes, la répartition géographique a beaucoup changé, elle est devenue beaucoup plus localisée (figure 1c). En effet, surtout depuis les années 2000, l'infection se concentre principalement dans certaines régions comme la Côte-d'Or et la Dordogne, mais aussi dans le Sud-Ouest, la Camargue et la Normandie.

Suite à l'analyse par typage VNTR et spoligotypage de 1 986 souches entre 1978 et 2011, 540 profils génotypiques différents ont été identifiés. Durant la première période, 59 génotypes différents ont été caractérisés sur 245 souches de *M. bovis*. Durant la deuxième période, 116 génotypes ont été identifiés sur 1 032 souches. Durant la troisième période, 62 génotypes ont été déterminés sur 1 865 souches identifiées. Au cours de cette dernière période, le nombre de souches isolées a fortement augmenté grâce au nombre de recrutement de souches par foyer bovin ainsi qu'à l'isolement de souches lors d'enquêtes dans la faune sauvage. Malgré cette augmentation du nombre de souches, les niveaux de prévalence/incidence de la maladie ont fortement diminués pendant la période étudiée, tout comme la diversité génotypique de la bactérie qui a diminué au cours du temps (figures 1a et b).

### 2. VARIABILITÉ SPOLIGOTYPIQUE DES SOUCHES FRANÇAISES DE *M. BOVIS*

Il existe 149 spoligotypes différents en France, dont les 20 plus importants sont présentés dans la

figure 2, avec leurs pourcentages respectifs sur la période 1978–2011. Ces spoligotypes évoluent au cours des années et suivant la région étudiée, en types et en prévalence. Il existe deux spoligotypes qui représentent 44 % de la totalité des souches : SB0120 (ou BCG-like) et SB0134 (ou GB35). Ces deux types de souches sont communs à toutes les périodes et sont repartis sur l'ensemble du territoire. Ils sont décrits de manière plus approfondie dans les sections suivantes.

#### 2.1. ANALYSE APPROFONDIE DU SPOLIGOTYPE SB0120 PAR TYPAGE VNTR

Ce spoligotype est très répandu en France durant la totalité de la période étudiée, il représente 30 % de la totalité des souches de *M. bovis* identifiées. Entre 1978 et 2011, sur les 968 souches de type SB0120, 146 profils VNTR différents ont été déterminés parmi les 600 souches préalablement spoligotypées.

**De 1978 à 1990**, 93 souches, c.à.d. 38 % de la population globale des souches isolées pour cette période (tout spoligotype confondu), ont présentées le type SB0120. Le typage VNTR a identifié 40 profils différents.

Au cours de la deuxième période (**1991 - 2000**), le nombre de souches SB0120 identifiées était de 240 souches, soit 23 % du total de souches isolées pour cette période. Le nombre de profils VNTR a également augmenté avec 91 profils pour 184 souches de type SB0120.

**Entre 2001 et 2011**, 634 souches de type SB0120 (34 % des souches de la période) ont été identifiées, dont 353 analysées par typage VNTR. Seuls 43 profils VNTR différents ont été identifiés durant cette période.

Figure 1

**Distribution des souches de *M. bovis* françaises et diversité génotypique**

1.a : Évolution de la prévalence et de l'incidence de la tuberculose bovine entre 1978 et 2011

1.b : Diversité génotypique par période

1.c : Distribution géographique des souches de *M. bovis*

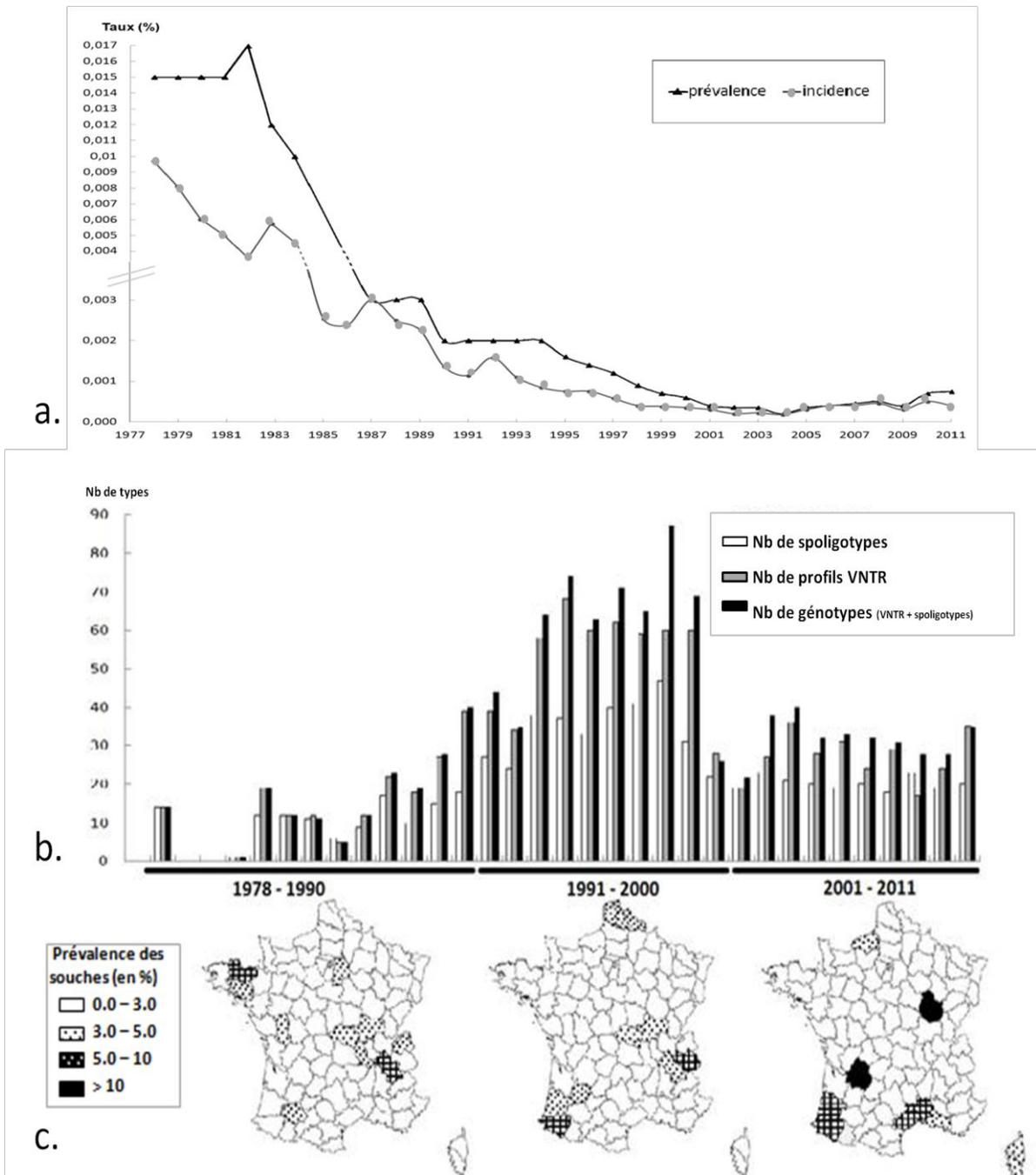
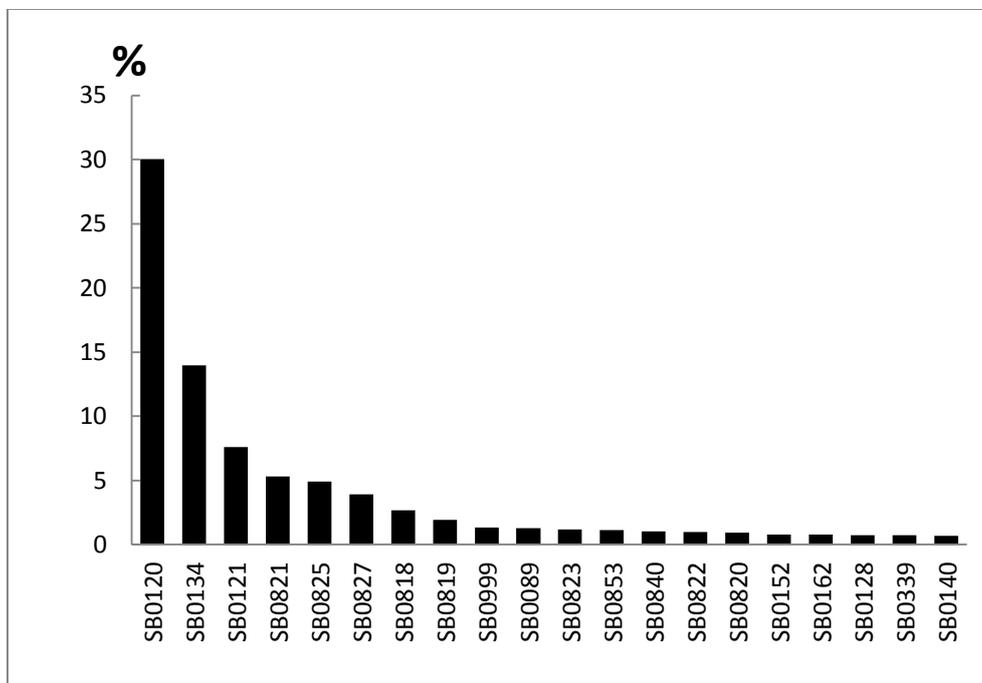


Figure 2

Répartition des 20 spoligotypes de *M. bovis* les plus présents en France de 1978 à 2011

X = spoligotype ; Y = % sur le total des souches isolées de 1978 à 2011



Le tableau 1 représente les cinq profils VNTR les plus représentatifs du type SB0120 sur la période 1978 – 2011, ainsi que les régions où ils ont été identifiés. Parmi les 146 profils VNTR identifiés pour les trois périodes, deux ressortent principalement car ils représentent plus de 47 % des profils trouvés : le profil-5 3 5 3 9 4 5 6, principalement présent en Dordogne et régions limitrophes, et le profil-5 5 4 3 11 4 5 6, localisé spécifiquement en Côte-d'Or. Ces profils majoritaires sont communs aux animaux de rente et à la faune sauvage (voir section 4).

Au cours du temps, certains profils VNTR apparaissent, d'autres disparaissent alors que certains se maintiennent durant les différentes périodes. Par exemple, les deux profils VNTR prédominants sont apparus au cours de la deuxième période et ils semblent se disperser sur plusieurs régions (tableau 1). Les trois autres profils VNTR présentés ont quasiment, voir totalement, disparus du territoire au cours de la dernière période. Les souches de type SB0120 de la région Rhône-Alpes par exemple, très présentes durant les deux premières périodes, ont drastiquement diminué depuis les années 2000.

## 2.2. ANALYSE APPROFONDIE DU SPOLIGOTYPE SB0134 PAR LA MÉTHODE DE TYPAGE VNTR

Le type SB0134 est le deuxième spoligotype le plus fréquent en France. Il représente 14 % de la totalité des souches de *M. bovis* identifiées entre 1978 et 2011. Bien qu'il soit réparti sur l'ensemble du territoire, il est surtout localisé en Côte-d'Or, en Normandie, en lien avec les foyers de la faune sauvage de la Forêt de Brotonne [Zanella *et al.*, 2008], mais également dans la région Midi-Pyrénées. Le typage VNTR a identifié 51 profils différents pour la période 1978 à 2011.

**De 1978 à 1990**, 31 souches de type SB0134 ont été identifiées, ce qui représente 13 % de la population globale des *M. bovis* isolées en France à cette période. Le typage VNTR a montré 17 profils sur 21 souches testées.

Au cours de la période **1991-2000**, le nombre de souches de type SB0134 était de 45, soit 4 % de la population totale, avec 23 profils VNTR (pour 40 souches typées par cette méthode).

**Entre 2001 et 2011**, 374 souches de type SB0134 (20 % du total pour la période) ont été identifiées, dont 173 typées par VNTR montrant 18 profils VNTR différents.

Tableau 1

**Distribution des cinq profils VNTR principaux du type SB0120 au cours des trois différentes périodes.**

La distribution est représentée par le numéro de département.

ND (Non Déterminé) signifie l'absence d'identification du profil à la période concernée.

Le pourcentage est effectué sur les souches totalement typées par VNTR et dont le spoligotype est SB0120.

Profil VNTR (% total de souches)	Régions affectées		
	1978 - 1990	1991 - 2000	2001 - 2011
<b>5 3 5 3 9 4 5 6</b> (24,8 %)	ND	11, 36, 87	24, 16, 79, 87, 25, 35, 86
<b>5 5 4 3 11 4 5 6</b> (22,8 %)	ND	42, 26	21, 23, 01, 27
<b>5 5 5 3 11 4 5 6</b> (2,5 %)	38, 71, 16, 21, 26, 36, 74, 75, 76	14, 71, 38	16
<b>4 5 5 3 10 3 5 6</b> (2,3 %)	19, 38, 74	75, 74, 38, 42, 49, 71	ND
<b>7 4 5 3 11 3 6 6</b> (1,3 %)	43, 80	80, 14	ND

Parmi les 51 profils VNTR identifiés sur la totalité de la période, les 5 profils dominants sont présentés dans le tableau 2. Les souches de type SB0134 étaient peu isolées durant la première période. Le profil-6 4 5 3 6 4 3 6, principalement trouvé en Côte-d'Or, bien qu'étant présent également dans plusieurs autres régions, représente 53 % de la totalité des souches de type SB0134. Il a été identifié pendant la troisième période. Le profil-7 4 5 3 10 4 5 10 est celui des souches isolées autour et dans la Forêt de Brotonne, en Normandie, mais également dans d'autres départements alentours. Quant au profil-6 5 5 3 6 4 5 6, il s'agit de celui des souches à l'origine de nombreux cas dans les régions limitrophes des départements de l'Ariège et de la Haute-Garonne. Ces deux profils ont été identifiés chez des souches isolées entre 1991 et 2011. Ces trois profils VNTR principaux ont été trouvés aussi bien chez des animaux de rente que de la faune sauvage (voir section 4). Les profils-4 5 5 3 9 4 5 7 et -5 4 5 3 11 4 5 6, apparus eux aussi au cours de la deuxième période, ont été très éphémères et ont disparu avant la troisième période.

### 3. ÉTUDE D'UNE FAMILLE PARTICULIÈRE DE SOUCHES : LA FAMILLE F4

La famille F4 représente un cas à part. Elle est définie à la fois par l'absence du « spacer » 33 du

spoligotypage dans la région DR et par la présence d'une répétition tronquée (signifiée par un « s ») sur les allèles du locus QUB 26 dans son profil VNTR. Les souches de cette famille se localisent principalement dans le Sud de la France.

Entre 1978 et 2011, 405 souches de cette famille ont été identifiées, soit 13 % de la totalité des *M. bovis*. Cette famille comprend 25 profils spoligotypes, 66 profils VNTR représentant au total 88 génotypes différents. De 1978 à 1990, 11 souches de la famille F4, avec 7 spoligotypes différents et 8 profils VNTR différents, ont été identifiées, ce qui représentait 4 % de la population globale des souches de *M. bovis* isolées en France pour cette période. Au cours de la deuxième période, leur nombre a augmenté avec 132 représentants de cette famille, soit 13 % de la population totale des souches isolées à cette période, avec 25 spoligotypes différents et 44 profils VNTR. Entre 2001 et 2011, 262 souches (14 %) ont été identifiées, 13 spoligotypes et 35 profils VNTR différents ont été caractérisés. De nombreux spoligotypes de cette famille sont associés à une région en particulier, où ils sont trouvés aussi bien chez les animaux de rente que chez la faune sauvage (voir section 4). Le spoligotype SB0840 (F1) est exclusif de la Corse. Le spoligotype SB0821 (F7) est très présent dans les Pyrénées-Atlantiques et dans les Landes, SB0818 (F4) est retrouvé autour de certaines zones

géographiques du Limousin, les spoligotypes SB0832 (F15) et SB0826 (F5) dans les Pyrénées-Atlantiques, le spoligotype SB0861 (F41), retrouvé chez les blaireaux et les animaux de rente, est spécifique du Lot-et-Garonne. SB0825 (F61) et

SB0827 (F23) sont les souches principales de la Camargue, exclusivement chez les bovins.

Les spoligotypes les plus représentatifs sont détaillés dans le tableau 3.

**Tableau 2**

**Distribution des cinq profils VNTR principaux des souches de type SB0134 aux trois différentes périodes.**

La distribution est représentée par le numéro de département.

ND (Non Déterminé) signifie l'absence d'identification du profil à la période concernée.

Le % est effectué sur les souches SB0134 totalement typées par VNTR.

Profil VNTR (% total de souches)	Régions affectées		
	1978 - 1990	1991 - 2000	2001 - 2011
<b>6 4 5 3 6 4 3 6</b> (53,4 %)	ND	ND	21, 74, 24, 22, 71, 01
<b>6 5 5 3 6 4 5 6</b> (9,0 %)	03	14	09, 31, 24
<b>7 4 5 3 10 4 5 10</b> (5,1 %)	ND	27, 44, 76	76, 14, 27, 31
<b>4 5 5 3 9 4 5 7</b> (3,0 %)	ND	36, 87	ND
<b>5 4 5 3 11 4 5 6</b> (2,1 %)	73	03, 45, 89	ND

**Tableau 3**

**Distribution des cinq spoligotypes les plus représentatifs de la famille F4.**

La distribution est représentée par le numéro de département.

ND (Non Déterminé) signifie l'absence d'identification du profil à la période concernée.

Profil VNTR (% total de souches)	1978 - 1990	1991 - 2000	2001 - 2011
<b>SB0821</b> (22,2 %)	ND	64, 40, 44, 61, 85	64, 40, 27, 30, 47, 49, 50, 53, 62
<b>SB0825</b> (21,7 %)	84	30, 11, 34, 40	30, 34, 13, 40, 11, 31
<b>SB0827</b> (12,8 %)	ND	10, 13, 34, 30, 32, 40	34, 30, 13, 35, 40
<b>SB0818</b> (10,6 %)	23	15, 43, 32, 40, 46, 82, 03, 19, 28, 48, 58, 63, 64, 71, 86	15, 12, 43, 79, 48, 64
<b>SB0840</b> (6,9 %)	ND	20	20

Les souches de la famille F4 sont peu représentées au cours de la première période, elles ont pu être identifiées avec plus de précision *a posteriori*, avec toujours une localisation préférentielle dans le Sud de la France. Bien que quelques cas sporadiques soient retrouvés ailleurs, ces souches sont spécifiquement localisées en Corse, en Camargue et dans le Sud-Ouest (Aquitaine, Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon).

#### 4. MYCOBACTERIUM BOVIS, UN SYSTÈME MULTI-HÔTES

Depuis les années 2000, et avec la découverte en France du premier foyer de tuberculose bovine

dans la faune sauvage [Zanella *et al.*, 2008], de nombreuses études ont été conduites pour étudier la présence de la bactérie chez des espèces sauvages, surtout dans des régions avec des problèmes persistants de tuberculose chez les bovins. Il est maintenant accepté que la bactérie peut évoluer dans un système multi-hôtes, affectant plusieurs espèces animales différentes incluant les animaux de rente. Les types de souches de *M. bovis* partagés par différentes espèces animales sont récapitulés dans le tableau 4. Le profil génétique unique des souches trouvées à la fois dans la faune sauvage et dans les animaux de rente par région supporte l'hypothèse d'un échange actif entre les différentes espèces.

Tableau 4

#### Distribution multi-hôtes dans les régions à forte prévalence.

« - » = plusieurs allèles pour le même locus du profil VNTR ; X = profil présent dans l'hôte concernée.

Localisation	Ardennes	Ariège	Bourgogne	Corse	Dordogne	Haute-Garonne	Lot et Garonne	Normandie	Pyrénées Atlantiques
Spoligotype	SB0120	SB0134	SB0120	SB0120	SB0999	SB0134	SB0823	SB0134	SB0821
Profil VNTR	535611468	65536456	554311456	455311---	64528247	65536456	65531125x8	7453104510	65531125x8
bovin	X	X	X	X	X	X	X	X	X
sanglier		X	X	X	X	X		X	X
hôte(s) cerf			X					X	
chevreuil									
blaireau	X		X		X		X		X
Spoligotype			SB0134	SB0840	SB0120				
Profil VNTR			64536436	75538-5x-	53539456				
bovin			X	X	X				
sanglier			X	X	X				
hôte(s) cerf			X						
chevreuil					X				
blaireau			X		X				

## IV - DISCUSSION

Pour étudier la dynamique de la tuberculose bovine française, les génotypes des souches de *M. bovis* isolées à partir d'animaux de rente ou sauvage, de 1978 à 2001, ont pu être identifiés grâce au spoligotyping et au typage VNTR. Ainsi, plus de 540 génotypes de *M. bovis* ont été répertoriés. Des fluctuations dans la variabilité génétique du bacille au cours du temps et en fonction de la zone géographique étudiée ont été constatées. Une forte réduction de la variabilité génétique des souches a eu lieu au cours des dix dernières années. Ce phénomène pourrait être lié à la pression de sélection due aux campagnes de contrôle de la tuberculose bovine, responsable de

la disparition de la maladie en particulier dans certaines régions (par exemple en Rhône-Alpes). Il faut également prendre en compte les phénomènes liés à l'évolution et au changement de la physiologie des pratiques d'élevages, avec l'apparition d'exploitations de grande taille, principalement d'élevages allaitants où la tuberculose bovine semble se concentrer à l'heure actuelle, et la réduction, voir la disparition, de l'élevage de certaines races bovines ayant pu héberger des souches particulières. Cependant, on ne peut pas exclure la sélection naturelle de souches plus résistantes ou mieux adaptées à l'environnement et/ou à l'hôte.

En parallèle de cette diminution de la variabilité génétique, il y a une diminution de la prévalence de la maladie en France, cependant, grâce à l'amélioration des techniques d'identification et d'échantillonnage, le nombre de souches de *M. bovis* à notre disposition a augmenté au cours du temps.

Deux types de *M. bovis* répartis sur l'ensemble du territoire à différentes époques prédominent en France : SB0120 (BCG-like) et SB0134 (GB35), comptant respectivement pour 30 % et 14 % de la totalité des souches. SB0120, le spoligotype français le plus important et le plus diversifié, possède deux profils VNTR principaux, 5 3 5 3 9 4 5 6 localisé en Dordogne et 5 5 4 3 11 4 5 6 spécifique de la Côte-d'Or, tous les deux apparus au cours des 10 dernières années. Le profil SB0134, le deuxième spoligotype le plus représenté, possède différents profils VNTR dont le plus important est 6 4 5 3 6 4 3 6, identifié depuis 2001, très présent en Côte-d'Or bien qu'il soit aussi retrouvé dans d'autres départements.

La famille de souches « F4 », principalement retrouvée dans le Sud de la France, regroupe différents spoligotypes très proches, représentant plus de 15 % des spoligotypes identifiés. Lorsqu'on s'intéresse aux cinq spoligotypes les plus représentés de cette famille, la plupart sont identifiés depuis les vingt dernières années. Les souches SB0821 (F7) se propagent en infectant de nouveaux départements. Ce type est isolé préférentiellement chez des bovins de la race blonde d'Aquitaine, dont l'élevage est actuellement très répandu en France. L'échange de bovins provenant des bassins d'élevage de certaines races vers d'autres régions explique en partie la découverte de nouveaux cas de souches de la famille F4, non seulement dans le Sud mais aussi dans d'autres départements, surtout depuis les dix dernières années. Certains types sont néanmoins particulièrement restreints au niveau géographique. C'est le cas du profil SB0840 (F1), localisé en Corse de par le caractère insulaire de son environnement et le peu d'échange d'animaux vers l'extérieur, ou des profils SB0825 et SB0827 (F23 et F61), enzootiques de la Camargue où l'élevage de races de taureaux de combat est exclusif de la région. Le type SB0818 (F4) est retrouvé dans moins de départements dans la troisième période que dans la deuxième, il se concentre dans certaines zones géographiques et rayonne autour du Limousin, où il semble avoir ses origines.

Dans les régions où la bTB est persistante, on constate que l'origine de foyers groupés est due à un seul génotype localement très répandu, aussi bien chez les bovins que dans la faune sauvage. Il a été démontré précédemment qu'il existe une souche de type SB0120 particulière en Dordogne et une autre spécifique de la Côte-d'Or, mais cette régionalisation est aussi constatée pour les souches de type SB0134, spécifiques de la Forêt de Brotonne ou de la Côte-d'Or suivant leurs profils VNTR. Pareillement, les souches de la famille F4 peuvent être associées à une région suivant leur spoligotype et leur profil VNTR. Ceci tend à prouver que la bactérie n'est pas adaptée à un hôte animal particulier mais qu'elle persiste en revanche dans un système multi-hôtes [Richomme *et al.*, 2010 ; Payne *et al.*, 2012 ].

Les méthodes d'identification moléculaire utilisées permettent un suivi précis de l'évolution de l'infection au cours du temps. Malgré ces très bons résultats, la méthode de génotypage que nous avons employée trouve ses limites pour expliquer la transmission des souches dans le cas de foyers régionalisés par un seul génotype, spoligotype-VNTR. En effet, pour adapter les mesures de contrôle actuelles au niveau local, de nouvelles méthodes de typage SNP, basées sur le séquençage du génome complet des bactéries, très discriminantes, sont à envisager. [Biek *et al.*, 2012].

Des travaux basés sur le séquençage génomique complet de souches de *M. bovis* sont actuellement en cours pour comprendre la persistance et la régionalisation de certaines souches. Des mutations dans le génome des bactéries, sur des séquences décrites comme ayant un lien avec la modulation de la virulence chez *M. tuberculosis* et *M. bovis* pourraient nous permettre de vérifier l'hypothèse que la persistance de *M. bovis* est liée à des caractères qui modifient leur virulence (étude de la virulence *in silico*). En effet, de récents travaux conduits en Irlande du Nord ont montrés que certains types de souches semblent avoir des caractères de virulence plus accrus en observant les cadres lésionnels provoqués par les différentes bactéries [Wright *et al.*, 2013]. Pour valider les possibles génotypes de virulence déduits *in silico*, une étude des phénotypes de virulence des souches devra être réalisée en utilisant différents modèles comme l'infection macrophagique ou les modèles d'infection *in vivo* chez la souris ou chez le bovin.

## BIBLIOGRAPHIE

- Biek R., O'Hare A., Wright D., Mallon T., McCormick C., Orton R.J., McDowell S. *et al.* - Whole Genome Sequencing Reveals Local Transmission Patterns of *Mycobacterium bovis* in Sympatric Cattle and Badger Populations. *PLoS Pathog.*, 2012, **8**(11), 29.
- Boulouis H.J., Haddad N. Maillard R. -Techniques d'étude moléculaire des isolats: Principes et fiabilité. *Epidémiol. et santé anim.*, 2001, **39**, 21-29.
- Frothingham R. - Differentiation of Strains in *Mycobacterium tuberculosis* Complex by DNA Sequence Polymorphisms, Including Rapid Identification of *M. Bovis* Bcg. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, **33**(4), 840-844.
- Haddad N., Masselot M., Durand B. - Molecular Differentiation of *Mycobacterium bovis* Isolates. Review of Main Techniques and Applications. *Res. Vet. Sci.*, 2004, **1**(76), 1-18.
- Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Masselot M., Thorel M.F., Hughes S.L., Inwald J., Hewinson R.G., Durand B. - Spoligotype Diversity of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**(10), 3623-3632.
- Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Thorel M.F., Durand B. - Le typage moléculaire des isolats de *mycobacterium bovis*. *Bulletin des GTV*, 2004, **23**, 39-49.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., *et al.* - Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**(4), 907-914.
- Payne A., Boschioli M.L., Gueneau E., Moyon J.L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J. - Bovine Tuberculosis in "Eurasian" Badgers (*Meles Meles*) in France. *Eur. J. Wildl. Res.*, 2013, **59**, 331-339.
- Richomme C., Boschioli M.L., Hars J., Casabianca F., Ducrot C. - Bovine Tuberculosis in Livestock and Wild Boar on the Mediterranean Island, Corsica. *J. Wildl. Dis.*, 2010, **46**(2), 627-631.
- Roring S., Scott A.N., Glyn Hewinson R., Neill S.D., Skuce R.A. - Evaluation of Variable Number Tandem Repeat (Vntr) Loci in Molecular Typing of *Mycobacterium Bovis* Isolates from Ireland." *Vet. Microbiol.*, 2004, **101**(1), 65-73.
- Skuce R., McCorry T.P., McCarroll J., Roring S., Scott A.E., Brittain D., Hughes M.S., Glyn Hewinson R., Neill S.D. - Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria Using Novel Vntr-Pcr Targets. *Microbiology*, 2002, **148**, 519-28.
- Wright D.M., Allen A.R., Mallon T.R., McDowell S.W., Bishop S.C., Glass E.J., Birmingham M.L., Woolliams J.A., Skuce R.A. - Field-Isolated Genotypes of *Mycobacterium bovis* Vary in Virulence and Influence Case Pathology but Do Not Affect Outbreak Size. *PLoS ONE* 8, 2013, **9**, e74503.
- Zanella G., Durand b., Hars J., Moutou F., Garin-Bastuji B., Duvauchelle A., Ferme M., Karoui C., Boschioli M.L. - *Mycobacterium bovis* in Wildlife in France. *J. Wildl. Dis.*, 2008, **44**(1), 99-108.
- Zhang J., Abadia E., Refregier G., Tafaj S., Boschioli M.L., Guillard B., Andremont A., Ruimy R., Sola C. - *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.*, 2010, **59**, no. Pt 3, 285-94.

