

DÉTECTION DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* DANS L'ENVIRONNEMENT : PREMIERS RÉSULTATS DES RECHERCHES MENÉES EN CÔTE-D'OR *

Élodie Barbier¹ et Alain Hartmann¹

RÉSUMÉ

Depuis les années 2000, en Côte-d'Or, on assiste à une recrudescence des cas de tuberculose à *Mycobacterium bovis* dans les cheptels bovins, associée à une contamination de la faune sauvage à proximité des élevages contaminés. Dans certaines zones du département, la faune sauvage infectée serait impliquée dans le retour de la maladie aux bovins. La transmission indirecte de la maladie par l'environnement semblerait une voie importante de la contamination entre faune sauvage et domestique.

Afin d'évaluer la prévalence de *M. bovis* dans l'environnement et d'évaluer le rôle de l'environnement dans la transmission indirecte de la maladie, nous avons développé des outils moléculaires de détection adaptés aux matrices environnementales complexes (sol, eau, matières fécales). Ces outils à la fois spécifiques et sensibles nous ont permis d'analyser de nombreux prélèvements réalisés en 2013. Seuls deux échantillons de sol se sont révélés faiblement positifs.

Mots-clés : tuberculose bovine, bovins, faune sauvage, environnement, PCR en temps réel.

SUMMARY

Since year 2000, an increasing number of cases of bovine tuberculosis were found in cattle in Côte-d'Or. These are caused Wild animals Infected by *Mycobacterium bovis* found near contaminated farms were considered as the likely source of contamination. We assume that contamination between wild and domestic animals may occur indirectly, by environmental factors (soil, water, feces).

To quantify the prevalence of *M. bovis* in the environment and to evaluate its role in indirect transmission of the disease between species, we developed molecular detection tools. These are adapted to complex environmental matrices (soil, water, feces), and are both specific and sensitive. They allowed us to analyze numerous samples collected in 2013. Two samples gave slight positive results.

Keywords: Bovine tuberculosis, Cattle, Wildlife, Environment, Real time PCR.



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

¹ INRA, UMR Agroécologie, 16 rue de Sully, BP 86510, 21065 Dijon, France

I - INTRODUCTION

Déclarée indemne de tuberculose bovine en 2000, la France connaît depuis 2002 une réémergence de l'infection dans certains départements, notamment en Côte-d'Or. Entre 2002 et aujourd'hui, 178 foyers ont été successivement déclarés dans ce département. Pour la saison 2012-2013, la moitié des cheptels infectés avaient déjà été déclarés foyer une, deux voire trois fois auparavant. La répartition des cas bovins sur le département n'est pas aléatoire, mais concentrée sur une zone assez réduite.

Deux spoligotypes principaux sont retrouvés chez les bovins : SB0120 (VNTR 5544), appelé plus simplement BCG-like dans la région de Vénarey-Les-Laumes et Vitteaux, et SB0134 (VNTR 5355), appelé GB35 dans la région de Pouilly-en-Auxois.

Parallèlement à l'infection bovine et à proximité d'un cheptel foyer, l'infection a été détectée pour la première fois chez un animal sauvage en 2003 chez un cerf. Entre 2003 et 2007, seulement deux sangliers en plus du cervidé ont été trouvés infectés. Depuis 2007, et chaque année, la maladie est régulièrement retrouvée chez des blaireaux et des sangliers, moins régulièrement chez les cerfs. Les animaux sauvages infectés sont majoritairement trouvés à proximité de cheptels bovins infectés.

L'hypothèse d'un cycle épidémiologique de transmission de la maladie entre bovins et faune sauvage est maintenant reconnue [Richomme *et al.*, 2010], même si celui-ci est encore mal connu. En France, les exemples de la forêt de Brotonne [Zanella *et al.*, 2008], de la Côte-d'Or, de la Dordogne [Payne *et al.*, 2012], de la Corse [Richomme *et al.*, 2010], et ceux de l'Espagne [Aranaz *et al.*, 2004], ont montré que les spoligotypes et les profils VNTR (Variable Number Tandem Repeat) des souches isolées chez les animaux sauvages tués ou piégés à proximité des cheptels bovins infectés sont exactement les mêmes que ceux des souches bovines. Cette identité des souches résulterait d'une transmission directe ou indirecte entre faune domestique et sauvage et vice et versa. Bien que quelques contacts directs soient possibles entre faune sauvage et bovins [Böhm *et al.*, 2009], il semble probable que la transmission indirecte de *M. bovis* soit la voie de transmission prépondérante entre bovin et faune sauvage et inversement. La transmission indirecte ferait intervenir une excrétion de *M. bovis* par les animaux infectés au

niveau respiratoire, salivaire, urinaire et/ou fécal : les animaux excréteurs déposeraient donc le bacille dans l'environnement par le biais de leurs excréments ; l'environnement deviendrait alors un réservoir potentiel pour le bacille. La contamination d'animaux sains pourrait se produire par ingestion ou inhalation d'aérosols produits à partir des matrices environnementales souillées. Par exemple, la formation de bioaérosols contaminés par des souches bactériennes d'actinomycètes thermotolérants est maintenant bien documentée à partir de matrices solides ou liquides [Betteli *et al.*, 2013]. Dans l'environnement des bovins, ces bioaérosols pourraient être formés à partir d'eau ou de mélanges eau-sédiments dans les zones d'abreuvement ou à partir de particules fines de sol (argiles).

L'excrétion respiratoire, salivaire, urinaire et fécale de *M. bovis* par des blaireaux tuberculeux a été documentée en Angleterre [Gallagher *et al.*, 1998 ; Gavier-Widen *et al.*, 2001 ; Corner *et al.*, 2011]. De plus, *Mycobacterium bovis* a la capacité de survivre en dehors de ses hôtes pendant des durées assez longues. Cette durée varie en fonction de la nature du support contaminé (eau, sol, foin, maïs, *etc.*), de la température, de l'humidité et de l'exposition aux UV [Courtenay *et al.*, 2006 ; Fine *et al.*, 2011 ; Ghodbane *et al.*, 2014]. La survie de *M. bovis* dans des microcosmes de sols contaminés soumis aux facteurs climatiques a même été démontrée aux Etats-Unis pour des durées allant jusqu'à environ 88 jours [Fine *et al.*, 2011].

La recherche de *M. bovis* par une méthode culturale dans l'environnement d'animaux infectés est souvent infructueuse [Pillai *et al.*, 2000 ; Michel *et al.*, 2007 ; Fine *et al.*, 2011], car elle se heurte à plusieurs difficultés : i) la vitesse de croissance très lente de *M. bovis*, de l'ordre de 45 jours qui impose un traitement préalable des échantillons de façon à détruire les micro-organismes à croissance plus rapide, ii) la richesse des matrices analysées (sol, sédiments, eau, matières fécales, *etc.*) en bactéries saprophytes et en champignons, très diversifiés, qui rendent la décontamination des échantillons très difficile. La décontamination a un effet non négligeable sur la viabilité de *M. bovis* et interfère avec la sensibilité de détection par la mise en culture [Fine, 2006]. L'immunocapture magnétique a été testée avec succès en Angleterre pour isoler et concentrer le bacille avant la mise en culture [Sweeney *et al.*, 2006 et 2007].

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique indépendante de la croissance de la bactérie. Quelques études ont permis la détection par PCR du bacille dans des sols et des latrines de blaireaux au Royaume-Uni et en Irlande à proximité de cheptels bovins infectés [Young *et al.*, 2005 ; Courtenay *et al.*, 2006 ; Sweeney *et al.*, 2006 et 2007].

Les objectifs de ce travail visaient, en premier lieu, à mettre au point un système de détection moléculaire à la fois spécifique du bacille et assez sensible pour détecter de faibles concentrations dans les différentes matrices environnementales suspectées pour leur rôle de réservoir potentiel. Ces nouveaux outils moléculaires nous

ont permis d'analyser les échantillons prélevés dans des parcelles partagées par les bovins et la faune sauvage. Ces parcelles ont été choisies car une transmission indirecte de l'infection entre animaux sauvages et domestiques était suspectée (origine de l'infection bovine indéterminée suite à l'enquête épidémiologique et présence d'animaux sauvages infectés à proximité). Cette approche permettra d'évaluer l'importance de la transmission indirecte du bacille entre les espèces et d'apprécier le rôle joué par l'environnement.

Cet article ne traite que de la détection moléculaire, la méthode fondée sur la culture étant toujours en cours de validation.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

La souche vaccinale *Mycobacterium bovis* BCG strain 1331 (SSI, Copenhague, Danemark) a été utilisée pour l'évaluation de la sensibilité de la PCR en temps réel (qPCR) sur souche pure et sur microcosmes de sol inoculé ainsi que pour la réalisation des gammes étalon de qPCR (PCR quantitative). Cette souche a été cultivée sur gélose Coletsos pendant 30 jours, puis remise en suspension dans du milieu Middlebrook 7H9 enrichi en ADC (Sigma Aldrich). Après mesure de la densité optique à 600nm, la suspension a été diluée en cascade au 1/10 pour inoculer les microcosmes de sol et d'eau. Un dénombrement des dilutions est ensuite réalisé sur milieu Middlebrook 7H11 enrichi en OADC (Sigma Aldrich).

Les ADN de 20 spoligotypes de *M. bovis* et de 30 souches de mycobactéries issus d'isolats cliniques d'animaux infectés ont été fournis par l'ANSES, Maisons-Alfort, pour les tests de spécificité (inclusion - exclusion) de la PCR en temps réel (tableau 1).

2. EXTRACTION DE L'ADN ET PURIFICATION

L'extraction d'ADN et la purification des microcosmes de sol, d'eau et des échantillons environnementaux a été réalisée selon le protocole modifié décrit par Ranjard *et al.* [2003].

Les échantillons d'eau ont été filtrés sur des membranes d'ester de cellulose de 0,45 µm de

porosité. Les filtres ont été broyés avec de l'azote liquide, puis l'ADN extrait selon la méthode précédemment citée, à l'exception de la purification sur colonnes PVPP (polyvinylpyrrolidone insoluble).

Les ADN extraits ont été quantifiés avec un spectrophotomètre (NanoDrop® 2000, Thermo Scientific) et dilués au 1/5, 1/10 et 1/20 pour la PCR en temps réel.

3. DÉVELOPPEMENT DE TROIS SYSTÈMES DE DÉTECTION MOLÉCULAIRE

La bibliographie nous a permis de sélectionner trois cibles génétiques situées sur des locus différents très spécifiques de *M. bovis* [Huard *et al.*, 2002 ; Brodin *et al.*, 2002]. Les génomes entièrement séquencés des mycobactéries du MTBC (complexe *M. tuberculosis* comprenant *M. bovis*) et des MNT (mycobactéries non tuberculeuses) sur le site NCBI nous ont permis d'aligner les séquences de ces trois gènes à la recherche de zones très conservées dans le MTBC. Chaque système de détection moléculaire en PCR temps réel créé comprend une amorce Forward, une amorce Reverse et une sonde oligonucléotidique marquée par deux fluorochromes (sonde TaqMan), choisies à l'aide du logiciel Primer3 (Simgene.com). Pour chaque système, nous avons également conçu des amorces de PCR à l'extérieur des séquences précédentes de façon à réaliser des PCR nichées

(utilisées uniquement en confirmation des PCR en temps réel positives).

4. SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DES SYSTÈMES DE DÉTECTION SUR SOUCHES PURES, SOL ET EAU

La spécificité des trois systèmes de détection a été testée par PCR en temps réel sur l'ADN de 19 spoligotypes différents de *M. bovis*, quatre souches de mycobactéries appartenant au MTBC, deux au Complexe *avium* et 20 MNT (tableau 1). Nous avons également vérifié que la PCR en temps réel ne donnait pas de signal sur des ADN extraits de 22 sols provenant du Morbihan, des Yvelines, du Haut-Rhin et de Côte-d'Or, prélevés en dehors des zones où sévit la tuberculose bovine. Ces sols présentent des caractéristiques physico-chimiques variées.

Pour déterminer la sensibilité de détection de la PCR en temps réel de chacun des systèmes, la quantification a été réalisée sur des dilutions du gène cible cloné dans un plasmide (gamme allant de 1 copie à 10^6 copies du gène recherché dans 5 μ l). La limite de détection de la PCR en temps réel dans le sol a été évaluée par l'inoculation de suspension bactérienne de *M. bovis* BCG dans un sol dont les caractéristiques physico-chimiques sont identiques aux sols incriminés en Côte-d'Or. Chaque microcosme de sol de 2g a été inoculé avec des suspensions bactériennes pour obtenir une concentration finale en bactéries variant de 10^1 à 10^5 CFU par g de sol. Des aliquotes de 100ml d'eau non stérile issue d'un ruisseau hors zone de tuberculose ont été inoculés avec ces mêmes concentrations.

Tableau 1

Souches bactériennes et spoligotypes utilisés pour évaluer la spécificité des trois systèmes de détection moléculaire

<i>M. bovis</i> (spoligotypes)	Mycobactéries du MTBC	Mycobactéries atypiques	Mycobactéries du Complexe <i>avium</i>
GB35	<i>M. microti</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. avium</i>
BCG	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. elephantis</i>	<i>M. intracellulare</i>
F1	<i>M. caprae</i>	<i>M. confluentis</i>	
F2	<i>M. pinnipedi</i>	<i>M. fortuitum</i>	
F5		<i>M. rufum</i>	
F6		<i>M. non chromogenicum</i>	
F7		<i>M. aichiense</i>	
F23		<i>M. thermoresitibile</i>	
F41		<i>M. xenopi</i>	
F57		<i>M. kansai</i>	
F61		<i>M. vaccae</i>	
F105		<i>M. arupense</i>	
F151		<i>M. chelonae</i>	
GB21		<i>M. porcinum</i>	
GB54		<i>M. parafinicum</i>	
SB0166		<i>M. celatum</i>	
SB0885		<i>M. intermedium</i>	
SB0999		<i>M. rutilum</i>	
SB1081		<i>M. smegmatis</i>	
		<i>M. szulgai</i>	

5. CHOIX DES SITES DE PRÉLÈVEMENTS

Les échantillons environnementaux ont été prélevés sur huit communes de Côte-d'Or situées dans la zone Nord entre mai et juillet 2013. Nous avons ciblé avec l'aide de la DDPP21 des parcelles :

- Sur lesquelles un ou plusieurs bovins, découverts infectés lors de la prophylaxie 2012-2013, ont pâturé en 2012 et pour lesquels l'origine de la contamination reste inexpliquée ;
- Autour desquelles la surveillance de la faune sauvage a mis en évidence l'infection à *M. bovis*

chez des blaireaux piégés ou des sangliers tués à la chasse.

Sur les pâtures, nous avons privilégié les zones susceptibles d'être fréquentées par les bovins et la faune sauvage : zones d'abreuvement (trous d'eau, sources, abreuvoirs), zones de nourrissage au sol. De l'eau, du sol et des sédiments ont été récoltés. Autour des parcelles, les terriers et matières fécales de blaireaux (latrines), ainsi que les zones d'abreuvement de la faune sauvage ont été prélevés.

III - RÉSULTATS

1. LES SYSTÈMES DE DÉTECTION CONÇUS SONT SPÉCIFIQUES DES ESPÈCES APPARTENANT AU MTBC *IN SILICO*

Les gènes ou locus cibles ont été choisis soit pour leur spécificité à *M. bovis*, soit pour leur absence chez *M. microti*, seule mycobactérie du complexe MTBC à avoir été décrite dans l'environnement avec *M. bovis*. Les systèmes de détection ciblant l'IS1561 et la région Rv3866 ont été choisis car ces locus sont présents chez tous les membres du MTBC mais absents chez *M. microti*, chez les mycobactéries du complexe *avium*, ainsi que chez les MNT [Huard *et al.*, 2002 ; Brodin *et al.*, 2002]. La région RD4, présente chez tous les membres du MTBC, est absente chez *M. bovis* [Huard *et al.*, 2002].

Deux systèmes de détection moléculaire, ciblant l'IS1561 et la région Rv3866 ont été réalisés à l'aide du logiciel Primer3. Le troisième système ciblant la zone encadrant la RD4 utilise une amorce Forward et une sonde déjà décrite [Sweeney *et al.*, 2007], seule l'amorce Reverse a été redessinée afin d'obtenir un produit PCR plus petit. La sonde utilisée ne peut se fixer que sur l'ADN des souches présentant la délétion. La spécificité des systèmes de détection a été démontrée *in silico*, par alignement de séquences à l'aide du programme BLAST®. Aucune détection croisée avec d'autres espèces que celles appartenant au MTBC n'a été mise en évidence *in silico* pour les systèmes de détection utilisés.

2. SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DES SYSTÈMES DE DÉTECTION SUR SOUCHES PURES ET MICROCOSMES DE SOL INOCULÉS

Sur les 18 spoligotypes de *M. bovis* testés, tous ont donné un signal fort et conservé lors de la PCR en temps réel (Cycle threshold = 20).

Dans le complexe MTBC, nous avons testé nos systèmes sur *M. microti*, *M. tuberculosis*, *M. caprae* et *M. pinnipedii*. Le système RD4 présente la plus grande spécificité, puisqu'il n'amplifie que *M. bovis* parmi les membres du complexe testés. L'IS1561 et la région Rv3866 donnent un signal identique pour *M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis* et *M. pinnipedii* mais ces systèmes n'amplifient pas *M. microti*. Même s'il a été montré que *M. tuberculosis* peut survivre expérimentalement dans le sol (Ghodbane *et al.*, 2014), seuls *M. microti* et *M. bovis* y ont été déjà décrits [Courtenay *et al.*, 2006 ; Sweeney *et al.*, 2006 et 2007].

Sur les 20 souches de MNT testées, cinq ont donné un très faible signal (Ct > 38) avec les trois systèmes de détection. Pour le complexe *avium*, seul *M. avium* a été détecté avec un Ct > 38.

Aucun des 22 sols testés n'a donné de signal en PCR en temps réel quel que soit le système de détection utilisé, ce qui indique une très bonne spécificité de ces systèmes de détection sur une large gamme de sols aux caractéristiques physico-chimiques différentes et contenant des communautés microbiennes variées.

En ce qui concerne la sensibilité des systèmes, la limite de détection des cibles se situe entre 1 et 10 copies lorsqu'on utilise des solutions de plasmide diluées. La répétabilité de la quantification des dilutions de plasmides est très bonne entre 10 et 10⁶ copies de gènes avec les trois systèmes. En revanche, en dessous de 10 copies, la détection est moins répétable (non détection dans certaines répétitions).

Sur les microcosmes de sol et d'eau inoculés, la limite de détection des cibles se situe à 10³ copies du gène par g de sol et à 10 copies du gène par ml d'eau.

Le système ciblant l'IS1561 semble être très légèrement plus sensible que les deux autres. Nous l'avons donc utilisé en 1^{ère} intention pour cribler l'ensemble des échantillons environnementaux.

3. PREMIERS RÉSULTATS SUR LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX

Sur les huit communes ciblées, 150 échantillons de sol, 18 échantillons de sédiments, cinq échantillons d'eau et huit échantillons de fèces de blaireaux ont été prélevés. Parmi les 150 sols prélevés, 28 l'ont été dans des terriers de blaireaux et de renards.

Parmi les terriers de blaireaux prélevés, certains étaient potentiellement des terriers de blaireaux infectés par *M. bovis*, car des animaux piégés à proximité se sont révélés être porteurs de *M. bovis*. Cependant en 2013, nous n'avons pu obtenir aucune certitude sur les terriers réellement occupés par les blaireaux porteurs de *M. bovis* (piégeage des blaireaux en coulée et non pas en gueule de terrier).

Sur les 181 échantillons analysés, seuls deux échantillons de sol dans deux communes différentes ont donné un signal en PCR en temps réel avec l'IS1561 à l'une des dilutions seulement. Ce signal est toutefois faible et n'a pas pu être reproduit avec les autres systèmes de détection. Un des échantillons positifs provient d'un terrier à proximité duquel un blaireau infecté a été piégé. Le second échantillon de sol a été prélevé dans une latrine de blaireau creusée sous une clôture de pré. L'analyse des fèces de cette latrine n'a toutefois pas donné de signal.

La campagne de prélèvement 2014 sera réalisée pour augmenter le nombre d'échantillons prélevés sur une zone plus restreinte, en particulier où des contaminations récurrentes des cheptels bovins ont été et sont observées.

IV - DISCUSSION

Mycobacterium bovis, l'agent de la tuberculose bovine, est une bactérie pathogène qui infecte les bovins et certains mammifères sauvages en France. La maîtrise de la maladie chez les bovins dans certains départements français semble être entravée par la proximité d'animaux sauvages infectés. La transmission indirecte du bacille entre faune sauvage et domestique par l'intermédiaire de l'environnement permettrait d'expliquer certains cas de re-contaminations chez les bovins. L'environnement pourrait servir de réservoir de la bactérie par le biais de l'excrétion animale ; il pourrait en retour infecter des animaux sains soit par inhalation d'aérosols contaminés soit par ingestion (abreuvement). Quelques études, en Angleterre et en Irlande, ont mis en évidence la présence de *M. bovis* dans des sols de prés, des sols de terriers et des latrines de blaireaux à proximité de cheptels bovins infectés [Courtenay *et al.*, 2006 ; Sweeney *et al.*, 2006 et 2007 ; Young *et al.*, 2005 ; Travis *et al.*, 2011]. Des études expérimentales ont montré que *M. bovis* pouvait

survivre plusieurs mois dans le sol [Maddock, 1933 ; Young *et al.*, 2005 ; Fine *et al.*, 2011 ; Ghodbane *et al.*, 2014], tout en restant virulent [Maddock, 1933 ; Ghodbane *et al.*, 2014]. La détection du bacille dans l'environnement fréquenté par les animaux domestiques ou sauvages infectés n'a jamais été décrite en France. Dans certaines zones de Côte-d'Or, la transmission indirecte du bacille aux bovins par l'environnement est fortement suspectée.

Dans cette étude, nous avons développé trois systèmes de détection moléculaire afin d'optimiser la mise en évidence de *M. bovis* dans des échantillons environnementaux complexes, afin de s'affranchir de la culture. En effet, l'isolement de *M. bovis* dans les matrices environnementales par la culture est long car, d'une part, un traitement préalable est nécessaire pour s'affranchir de la flore microbienne de contamination et, d'autre part, le bacille a une croissance très lente. Contrairement à la culture, la technique de PCR en

temps réel permet une détection rapide du bacille, sous réserve que le ou les gènes ciblés soient très spécifiques, de façon à détecter et quantifier une espèce bactérienne particulière dans un mélange d'ADN complexe. Mais cette technique rencontre néanmoins quelques limites techniques :

- Les échantillons environnementaux contiennent une flore microbienne et animale abondante et variée ; l'ADN extrait contient une grande diversité de séquences génétiques à l'origine de faux positifs. Ainsi, des espèces proches de *M. bovis*, notamment les mycobactéries environnementales, ainsi que des espèces encore inconnues, peuvent être présentes dans les échantillons. Il est donc nécessaire de s'assurer de la spécificité des systèmes de détection. La détection du bacille par la recherche associée de trois cibles génétiques avec le système TaqMan nous a permis de développer une méthode de détection moléculaire spécifique et sensible de *M. bovis* dans des matrices complexes ;
- L'extraction d'ADN de matrices environnementales s'accompagne d'une co-extraction d'inhibiteurs potentiels de la PCR (acides humiques, polyphénols, polysaccharides et métaux). L'acide humique, par exemple, inhibe l'activité de la Taq polymérase [Kermekchiev *et al.*, 2009] et se lie sur des sites spécifiques de l'ADN empêchant son amplification [Opel *et al.*, 2010]. La dilution des échantillons d'ADN utilisés en PCR en temps réel permet la dilution des inhibiteurs et limite leur action. Toutefois, lorsque la cible recherchée est présente en petit nombre de copies, la dilution de l'ADN rend la détection moins efficace. C'est pourquoi nous analysons l'ADN extrait pur et dilué au 1/5, au 1/10 et au 1/20 en PCR en temps réel, de façon à rechercher la quantité d'inhibiteurs minimale permettant d'amplifier la cible ;
- Les limites de détection de la PCR se situent au mieux autour de 1000 copies de gènes par g de sol. Les seuils de détection des trois systèmes que nous avons créés se situent au-dessus de 1000 copies du gène par g de sol ce qui correspond à des valeurs en adéquation avec d'autres résultats obtenus sur la détection de bactéries dans les sols [Ibekwe et Grieve, 2003].

En 2013, seulement deux des échantillons analysés ont donné un signal faible avec un des systèmes de détection moléculaire. Il s'agissait dans les deux cas d'échantillons de sol : un sol de terrier probablement habité par un blaireau infecté et un sol de latrine. Nous n'avons pu répéter les résultats probablement à cause de la faible charge en *M. bovis* des échantillons analysés, en dessous de la limite de détection de nos outils. Il reste difficile d'isoler *M. bovis* de l'environnement, malgré la sensibilité et la spécificité des techniques utilisées. Plusieurs études, malgré l'abondance de prélèvements réalisés, ont été infructueuses [Pillai *et al.*, 2000 ; Michel *et al.*, 2007 ; Fine *et al.*, 2011]. Cette difficulté résulte des limites techniques précédemment citées, mais également du caractère variable et intermittent de l'excrétion de *M. bovis* par les animaux infectés.

L'excrétion de la bactérie par la voie respiratoire, les urines, les matières fécales ou les plaies de morsure n'est pas systématique chez les blaireaux infectés. Le niveau d'excrétion dépend de la localisation et de l'intensité des lésions. Il semble que l'excrétion la plus importante soit trouvée chez des animaux à un stade avancé de la maladie [Gallagher *et al.*, 1998 ; Corner *et al.*, 2012]. En Côte-d'Or, une étude menée entre 2009 et 2011 a montré que seuls 1,7 % des blaireaux piégés et analysés (19 sur 1 146) présentaient des lésions visibles, alors que la bactérie était retrouvée sur 5,6 % des blaireaux (49 sur 878) dans la zone de tuberculose bovine [Payne *et al.*, 2012]. L'absence de lésion visible sur la majorité des blaireaux analysés pourrait expliquer une absence d'excrétion ou une faible excrétion de *M. bovis* dans l'environnement.

Une autre difficulté réside dans la réalisation spatiale et temporelle de l'échantillonnage. Les bacilles sont excrétés par les animaux sur de petites zones bien localisées. Hormis les latrines de blaireaux bien visibles, les prélèvements à l'échelle d'une parcelle, d'un terrier, d'une source, sont réalisés de manière ponctuelle et au hasard ce qui diminue la probabilité de détection de cette bactérie. De plus, nous avons toujours un temps de décalage entre le dépistage des bovins ou des animaux sauvages infectés et la date des prélèvements, car la certitude du diagnostic animal nécessite plusieurs semaines.

V - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons développé des outils de PCR en temps réel à la fois spécifiques et sensibles pour la détection de *M. bovis* dans les matrices environnementales. Malgré le nombre important d'échantillons analysés, seuls deux échantillons peu chargés en *M. bovis* ont pu être mis en évidence. Ces outils de PCR en temps réel vont encore être optimisés en 2014 et permettre

l'analyse des nombreux prélèvements prévus dans des zones plus ciblées de Côte-d'Or dans lesquelles bovins et faune sauvage infectés ont été retrouvés. Plusieurs méthodes de culture sont en cours d'essai et seront utilisées sur les échantillons prélevés afin de montrer la viabilité des bactéries dans l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Aranaz A., De Juan L., Montero N., Sánchez C., Galka M., Delso C., Alvarez J., Romero B., Bezos J., Vela A.I., Briones V., Mateos A., Domínguez L. - Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 2004, **42**, 2602-2608.
- Betelli L., Duquenne P., Grenouillet F., Simon X., Scherer E., Géhin E., Hartmann A. - Development and evaluation of a method for the quantification of airborne *Thermoactinomyces vulgaris* by real-time PCR. *Journal of microbiological methods*, 2013, **92**, 25-32.
- Böhm M., Hutchings M.R., White P.C.L. - Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. *PLoS One*, 2009, **4**(4), e5016.
- Brodin P., Eiglmeier K., Marmiesse M., Garnier T., Niemann S., Cole S.T., Brosch R., Billault A. - Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6. *Infection and immunity*, 2002, **70**, 10, 5568-5578.
- Colinon C., Deredjian A., Hien E., Brothier E., Bouziri L., Cournoyer B., Hartman A., Henry S., Jolivet C., Ranjard L., Nazaret S. - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an *ecfX* qPCR assay. *Journal of applied microbiology*, 2013, **114**, 1734-1749.
- Corner L.A.L., Murphy D., Gormley E. - *Mycobacterium bovis* infection in the Eurasian badger (*Meles meles*): the disease, pathogenesis, epidemiology and control. *Journal of comparative pathology*, 2011, **144**, 1-24.
- Corner L.A.L., O'Meara D., Costello E., Lesellier S., Gormley E. - The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 2012, **194**, 166-172.
- Courtenay O., Reilly L.A., Sweeney F.P., Hibberd V., Bryan S., Ul-Hassan A., Newman C., Macdonald D.W., Delahay R.J., Wilson G.J., Wellington E.M.H. - Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biology letters*, 2006, **2**, 460-462.
- Fine A.E. - The Role of Indirect Transmission in the Epidemiology of Bovine Tuberculosis in Cattle and White-Tailed Deer in Michigan. 2006. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, Michigan State University.
- Fine A.E., Bolin C.A., Gardiner J.C., Kaneene J.B. - A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Veterinary medicine international*, 2011, **2011**, 765430.
- Gallagher J., Clifton-Hadley R.S. - Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Research in veterinary science*, 2000, **69**, 203-217.

- Gallagher J., Monies R., Gavier-Widen M., Rule B. - Role of infected, non-diseased badgers in the pathogenesis of tuberculosis in the badger. *Veterinary Record*, 1998, **142**, 710-714.
- Gavier-Widen D., Chambers M.A., Palmer N., Newell D.G., Hewinson R.G. - Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. *Veterinary Record*, 2001, **148**(10), 299-304.
- Ghodbane R., Mba Medie F., Lepidi H., Nappes C., Drancourt M. - Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology (Reading, England)*, 2014, **160**(Pt 3), 496-501.
- Goodchild A.V., Clifton-Hadley R.S. - Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2001, **81**, 23-41.
- Huard R. C., Claudio L., Lazzarini D.O., Butler W.R., Soolingen D. Van, Ho J.L. - PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *Journal of clinical microbiology*, 2003, **41**, 1637-1650.
- Ibekwe A.M., Grieve C.M. - Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **94**(3), 421-431.
- Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. - Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic acids research*, 2009, **37**, e40.
- Maddock E.C. - Studies on the survival time of the bovine tubercle bacillus in soil, soil and dung, in dung and on grass, with experiments on the preliminary treatment of infected organic matter and the cultivation of the organism. *The Journal of Hygiene*, 1933, **33**(1), 103-117.
- Michel A.L., de Klerk L.M., Gey van Pittius N.C., Warren R.M., van Helden P.D. - Bovine tuberculosis in African buffaloes: observations regarding *Mycobacterium bovis* shedding into water and exposure to environmental mycobacteria. *BMC Veterinary Research*, 2007, **3**, 23.
- Neill S., Hanna J., O'Brien J., McCracken R. - Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Veterinary Record*, 1988, **123**, 340-343.
- Opel K.L., Chung D., McCord B.R. - A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of forensic sciences*, 2010, **55**, 25-33.
- Palmer M.V., Whipple D.L., Waters W.R., Mitchell V., Diana L., Ray W., Transmission E.D. - Experimental Deer-To-Deer Transmission of *Mycobacterium bovis* Experimental deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *American journal of veterinary research*, 2001, **62**, 692-696.
- Payne A., Boschioli M.L., Gueneau E., Moyen J.L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J. - Bovine tuberculosis in "Eurasian" badgers (*Meles meles*) in France. *European Journal of Wildlife Research*, 2012, **59**, 331-339.
- Pillai S.D., Widmer K.W., Ivey L.J., Coker K.C., Newman E., Lingsweiler S., Baca D., Kelley M., Davis D.S., Silvy N.J., Adams L.G. - Failure to identify non-bovine reservoirs of *Mycobacterium bovis* in a region with a history of infected dairy-cattle herds. *Preventive veterinary medicine*, 2000, **43**, 53-62.
- Ranjard L., Lejon D.P.H., Mougél C., Schehrer L., Merdinoglu D., Chaussod R. - Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(11), 1111-1120.
- Richomme C., Boschioli M.L., Hars J., Casabianca F., Ducrot C. - Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean island, Corsica. *Journal of wildlife diseases*, 2010, **46**, 627-631.
- Sweeney F.P., Courtenay O., Ul-Hassan A., Hibberd V., Reilly L.A., Wellington E.M.H. - Immunomagnetic recovery of *Mycobacterium bovis* from naturally infected environmental samples. *Letters in applied microbiology*, 2006, **43**, 364-369.
- Sweeney F.P., Courtenay O., Hibberd V., Hewinson R.G., Reilly L.A., Gaze W.H., Wellington E.M.H. - Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by real-time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Applied and environmental microbiology*, 2007, **73**, 7471-7473.

Travis E.R., Gaze W.H., Pontiroli A., Sweeney F.P., Porter D., Mason S., Keeling M.J.C., Jones R.M., Sawyer J., Aranaz A., Rizaldos E.C., Cork J., Delahay R.J., Wilson G.J., Hewinson R.G., Courtenay O., Wellington E.M.H. - An inter-laboratory validation of a real time PCR assay to measure host excretion of bacterial pathogens, particularly of *Mycobacterium bovis*. *PloS One*, 2011, **6**(11), e27369.

Walter W.D., Anderson C.W., Smith R., Vanderklok M., Averill J.J., Vercauteren K.C. - On-farm mitigation of transmission of tuberculosis from white-tailed deer to cattle: literature review

and recommendations. *Veterinary medicine international*, 2012, 2012, 616318.

Young J.S., Gormley E., Wellington E.M.H. - Molecular Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in Soil. *Applied and environmental microbiology*, 2005, **71**, 1946-1952.

Zanella G., Durand B., Hars J., Moutou F., Garin-Bastuji B., Duvauchelle A., Fermé M., Karoui C., Boschioli M.L. - *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *Journal of wildlife diseases*, 2008, **44**, 99-108.

