

RECONSTITUTION DE SCÉNARIOS DE TRANSMISSION DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* ENTRE ANIMAUX DOMESTIQUES ET SAUVAGES *

Michelet Lorraine¹, Courcoul Aurélie², Durand Benoît² et Boschioli Maria Laura¹



RÉSUMÉ

Le génotypage de *Mycobacterium bovis*, utilisant des techniques classiques (spoligotypage et MLVA), permet de tracer l'origine de l'infection d'un très grand nombre de foyers de tuberculose bovine et de mettre en évidence une éventuelle transmission inter-espèces. Cependant, dans les zones où l'incidence de la maladie est la plus forte, des profils génotypiques dominants sont partagés par la quasi-totalité des isolats, ce qui rend la reconstitution de la chaîne de transmission impossible. L'utilisation du séquençage du génome complet, comme méthode de génotypage à très fine résolution, peut permettre de différencier des souches clonales de même génotype dans une zone de forte incidence et de reconstituer des scénarios de transmission. Ce type d'approche a été utilisé dans une zone de forte endémicité en Côte-d'Or. L'utilisation d'un modèle mathématique permettra d'intégrer des paramètres épidémiologiques combinés aux données de typage et de caractérisation génomique afin de mieux comprendre le réseau de transmission de la tuberculose bovine en Côte-d'Or.

Mots-clés : *Mycobacterium bovis*, tuberculose bovine, génome complet, scénario de transmission.

ABSTRACT

The genotyping of *Mycobacterium bovis* using conventional techniques (spoligotyping and MLVA), allows to trace the origin of the infection of a very large number of outbreaks of bovine tuberculosis and to highlight a possible inter-species transmission. However, in areas with the highest incidence of the disease, dominant genotype patterns are shared by almost all isolates, making reconstitution of the transmission chain impossible. The use of whole genome sequencing, as a very fine resolution typing method, can make possible to differentiate clonal strains of the same genotype in a zone of high incidence and to rebuild transmission scenarios. This method has been used in the case of the French "Département de Côte-d'Or", area where endemic tuberculosis is noticed during last years. The use of a mathematical model will integrate epidemiological parameters combined with typing and genomic data to better understand the transmission network of bovine tuberculosis in "Côte-d'Or".

Keywords: *Mycobacterium bovis*, Bovine tuberculosis, Whole genome, Transmission scenario.



Article reçu le 4 juin 2018 ; accepté le 21 novembre 2018

* Texte de la communication présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA, 1^{er} juin 2018

¹ LNR Tuberculose, UZB, Laboratoire de santé animale, Anses, Maisons-Alfort, France

² EPI, Laboratoire de santé animale, Anses, Maisons-Alfort, France

I - INTRODUCTION

Les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, auquel appartiennent les agents de la tuberculose bovine (bTB), *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium caprae*, sont d'excellents microorganismes pour réaliser des études d'épidémiologie moléculaire sur la base de leurs caractères génotypiques. Dans le cas de la tuberculose bovine, deux méthodes de génotypage sont largement utilisées, le spoligotypage [Zhang *et al.*, 2010] et le typage MLVA (Multiple Loci VNTR Analysis) [Skuce *et al.*, 2005], qui permettent d'établir une différenciation entre souches de *M. bovis* en tenant compte d'une relative stabilité génétique. La combinaison de ces deux techniques permet une différenciation très fine des souches ; ainsi 497 génotypes différents ont pu être identifiés en France entre 1978 et 2013 à partir des souches de *M. bovis* isolées dans des foyers bovins et chez des animaux sauvages [Hauer *et al.*, 2015 ; Hauer *et al.*, 2016]. La très vaste diversité théorique des profils moléculaires obtenus en combinant ces deux techniques permet, en comparant entre eux les profils des souches isolées de bovins et d'animaux sauvages, de déterminer l'origine de l'infection d'un très grand nombre de foyers et mettre en évidence une éventuelle transmission inter-espèces [Boschiroli *et al.*, 2015]. Sur le terrain, cependant, la situation est différente : dans les zones où l'incidence de la maladie est la plus forte, des profils génotypiques dominants par zone sont partagés par la quasi-totalité des isolats, ce qui rend la reconstitution de la chaîne de transmission impossible [Boschiroli *et al.*, 2015 ; Cavalerie *et al.*, 2015].

Il devient alors nécessaire d'utiliser des techniques moléculaires à très fine résolution pour être à même de tracer l'infection au sein d'une zone

géographique de taille réduite. Le séquençage complet du génome de la bactérie, qui permet de détecter des changements génomiques à très petite échelle, semble la technique la plus adaptée. Cette technique a été notamment utilisée afin de mieux comprendre la transmission interhumaine de différentes mycobactéries, telle que *M. leprae* [Turankar *et al.*, 2014] ou *M. tuberculosis* [Roetzer *et al.*, 2013]. Les données produites peuvent être utilisées pour reconstituer des scénarios de transmission de l'infection. La combinaison de ces données génomiques à un modèle mathématique a été explorée, notamment pour étudier l'épidémiologie de certains virus à évolution rapide [Mollentze *et al.*, 2014]. Ce type d'approche est encore largement inexploré pour les bactéries, en particulier les mycobactéries à croissance lente, pour lesquelles l'intervalle entre la contamination d'un individu et la collecte d'échantillon infecté est inconnu mais probablement long, et pour lesquelles le taux d'évolution est très faible [Biek *et al.*, 2012].

Les objectifs de ce travail étaient de déterminer au sein d'une même zone géographique de Côte-d'Or les liens :

- entre troupeaux bovins infectés et
- entre troupeaux bovins infectés et faune sauvage infectée,

via l'analyse des séquences génomiques complètes des souches de *M. bovis* isolées dans la zone. Cette étude cherchait à différencier la résurgence de l'infection, d'une nouvelle contamination et à apporter des éléments de compréhension du rôle de la faune sauvage dans la circulation de l'infection au sein de la zone.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CHOIX DE LA ZONE ET SÉLECTION DES SOUCHES

La zone d'étude, d'environ 30 km du nord au sud sur 15 km d'est en ouest, se situe en Côte-d'Or. Elle comprend un ensemble de 34 communes limitrophes choisies de façon que :

- Le nombre d'isolats issus de la zone d'étude soit le plus élevé possible, le plus varié possible (en

termes d'espèces hôtes), tout en ayant une profondeur temporelle (intervalle de temps entre la date d'isolement du premier et du dernier) la plus large possible ; et que,

- Les relations susceptibles d'avoir transmis l'infection soient majoritairement internes (*i.e.* que le système épidémiologique puisse être considéré comme relativement clos), qu'il

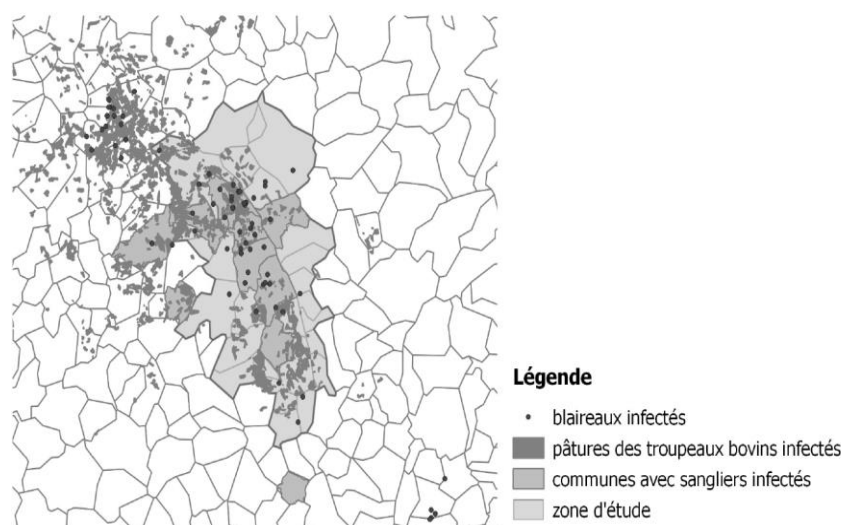
s'agisse de relations entre les foyers (voisinage de pâtures, commerce des bovins), entre les cas d'infection dans la faune sauvage (localisation des haies et zones boisées entre elles), et entre foyers et cas d'infection dans la faune sauvage (localisations relatives des haies, zones boisées des pâtures). Le nombre d'isolats disponibles dans la collection du LNR et obtenus dans la zone d'étude entre 2009 et 2015 était de 100 pour les bovins et de 83 pour les animaux sauvages (figure 1). Nous disposons également pour chaque échantillon bovin, de la date d'abattage de l'animal ainsi que de la date d'APDI (Arrêté Préfectoral de Déclaration d'Infection) et de la localisation des pâtures de son élevage et, pour les échantillons d'animaux sauvages, de la date d'abattage et de la localisation de l'animal (point GPS pour les blaireaux, commune pour les sangliers et les renards).

Ainsi, au sein de cette zone, toutes les souches de différents animaux de la faune sauvage disponibles au LNR ont été séquencées et un tirage au sort a été effectué pour les souches bovines (trois souches par cheptel et par an). Elles présentaient toutes le même génotype, ou des génotypes très proches, caractérisés par le spoligotype (SB0120 ou BCG) et le profil VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) (5 5 4 3 11 4 5 6), profil majoritaire de la région et identifié chez des bovins et dans la faune sauvage.

Au total, le panel se compose de 158 souches dont 81 souches isolées de bovins, 59 isolées de blaireaux, 16 isolées de sangliers et 2 isolées de renards (tableau 1) présentant le génotype majoritaire de la région ou un génotype très proche (un spacer de différence par rapport au profil SB0120 ou une répétition de différence sur un locus VNTR). Le tableau 2 résume le nombre de souches par cheptel selon les différentes situations épidémiologiques (un seul ou plusieurs APDI).

Figure 1

Localisation de la zone d'étude et des individus domestiques et sauvages qui y ont été détectés infectés de tuberculose bovine par une souche du génotype étudié entre 2009 et 2015



2. SÉQUENÇAGE COMPLET DES SOUCHES

Le séquençage complet du génome de ces souches a été réalisé par Genoscreen (Lille, France) avec la méthode Illumina (Rapid Run Hiseq en *paired-end reads* de type 2x250 pb). Un score de qualité Q30 a été nécessaire pour valider la manipulation, ce qui équivaut à un taux d'erreur de 1/1000. La profondeur de couverture théorique devait être de 50 fois (rapport entre la longueur de l'ensemble des séquences lues mises bout à bout et la longueur du

génomme cible). Huit génomes sur les 158 séquencés ne répondant pas à ces critères de qualité ont été écartés de l'analyse. L'analyse des polymorphismes nucléotidiques (SNP=*Single-Nucleotide Polymorphism*) et la construction par maximum de parcimonie d'un réseau phylogénétique permettant de visualiser les relations entre les souches en fonction des espèces ou du troupeau ont été réalisées avec le logiciel Bionumerics version 7.2 (*Applied Maths*).

Tableau 1
Description du panel de souches séquencées

Espèce animale	Nb de souches	Génotype	Année de collecte
Bovin	76	SB0120 - VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6	2009-2014
	1	SB0950* - VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6	2010
	4	SB0120 - VNTR 5 4* 4 3 11 4 5 6	2012
Blaireau	58	SB0120 - VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6	2009-2015
	1	SB0120 - VNTR 5 5 4 3 11 5* 5 6	2013
Renard	2	SB0120 - VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6	2010, 2014
Sanglier	16	SB0120 - VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6	2009-2012, 2014

* Le surlignage indique les différences de génotypes par rapport au profil majoritaire du panel

Tableau 2
Critères de sélection des souches bovines séquencées

	Nombre de cheptels	Nombre de souches
Cheptels avec une seule souche	23	23
Cheptels avec 2 souches - même APDI	5	10
Cheptels avec 3 souches - même APDI	5	15
Cheptels avec 3 souches - 2 APDI	2	6
Cheptels avec >3 souches - même APDI	3	14
Cheptels avec >3 souches - 2 APDI	3	13

Sur les 150 génomes restants, la recherche de variants (SNP) a été réalisée à l'aide du module wgSNP du logiciel Bionumerics. Les critères de filtres les plus stricts possible ont été utilisés afin d'obtenir les variants les plus informatifs : une distance minimale de 10 paires de bases entre 2 variants, une couverture minimale de 5 et l'élimination des variants avec un nucléotide indéterminé ou ambigu.

3. INFÉRENCE PHYLOGÉNÉTIQUE

Ces analyses ont été effectuées avec le logiciel BEAST v2.5.0 [Bouckaert *et al.*, 2014], en utilisant le modèle de substitution HKY [Hasegawa *et al.*, 1985]. Les autres paramètres utilisés sont le modèle bayésien « skyline » comme modèle de coalescence démographique [Drummond *et al.*, 2005] et une horloge moléculaire stricte avec une distribution normale, la moyenne correspondant à une estimation du taux de tuberculose bovine (0,2 SNP

par génome par an) [Trewby *et al.*, 2016]. La convergence a été déterminée pour que les tailles d'échantillon efficaces (ESS) soient supérieures à 200 pour tous les paramètres, comme déterminé dans Tracer (v1.6, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Les analyses ont été effectuées avec 100 millions d'itérations de la chaîne MCMC, afin d'obtenir la convergence désirée. Une analyse DATM (*Discrete Ancestral Trait Mapping*) [Lemey *et al.*, 2009] a été réalisée avec le logiciel BEAST. Selon l'espèce hôte échantillonnée, les isolats ont été assignés soit à un bovin soit à la faune sauvage. Sur la base de l'hôte identifié aux extrémités de l'arbre phylogénétique (chaque souche séquencée), le DATM estime les états ancestraux (chaque nœud de l'arbre) de la phylogénie, qui représentent les sources les plus probables d'infection dans la population échantillonnée de *M. bovis*, c'est-à-dire chez quel hôte se trouvait l'ancêtre commun de nos souches. Les arbres phylogénétiques obtenus ont été analysés et mis en forme avec le logiciel FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

III - RÉSULTATS

1. ANALYSE DES DONNÉES GÉNOMIQUES

Les lectures (fragments de 250 pb ou « reads » produits par le séquençage) des 150 souches ont été assemblées par rapport au génome de référence de la souche *M. bovis* AF2122. L'analyse préliminaire des génomes a mis en évidence un problème pour quatre souches. Les données de séquençage de ces souches n'ont pas permis d'obtenir un assemblage satisfaisant. En effet, pour deux de ces souches, moins de 3 % des lectures étaient utilisées pour l'assemblage. Après vérification, nous avons pu identifier par PCR temps réel la présence d'une souche de *Mycobacterium avium* dans un des lysats, en plus d'une souche de *M. bovis* [Michelet *et al.*, 2016]. On peut donc supposer que le génome de *M. avium* a été préférentiellement séquençé par rapport à celui de *M. bovis*. Pour les autres, les contrôles effectués ont permis d'identifier des séquences provenant d'autres microorganismes. Ces quatre souches ont donc été éliminées de la suite des analyses. La recherche de variants (SNP) a été réalisée sur les 146 génomes restants et a permis d'identifier un total de 112 variants parmi les 146 génomes étudiés.

2. ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE

Ces cent-douze variants ont donc été utilisés pour construire des arbres phylogénétiques représentant le réseau des 146 souches. La méthode utilisée a bien permis de différencier les souches et l'arbre phylogénétique obtenu nous montre clairement qu'il existe une réelle diversité génétique entre des souches qui partagent le même profil spoligotype et VNTR. La figure 2 illustre les réseaux de transmission selon les espèces (figure 2A) et selon les années de collecte (figure 2B). Sur ces figures, chaque nœud de l'arbre représente un ensemble d'isolats présentant des séquences identiques, et les liens relient entre eux les nœuds sur la base de la proximité des séquences. La taille des nœuds est proportionnelle au nombre d'isolats présentant la

même séquence, et la répartition de ces isolats par espèce hôte (figure 2A) et par année d'isolement (figure 2B) est représentée sous la forme de diagrammes en secteurs, formant des rosaces. On peut observer que certaines souches perdurent (et apparaissent sous forme de rosaces dans la figure 2B) alors que d'autres évoluent avec des mutations au cours du temps. La figure met en évidence deux rosaces de taille plus importante que les autres ; la première regroupe 14 souches isolées entre 2009 et 2013 (figure 2B) chez des bovins, sangliers et blaireaux (figure 2A) ; et la seconde regroupe 11 souches isolées entre 2010 et 2014 (figure 2B) chez toutes les espèces étudiées (figure 2A).

La diversité génétique des souches isolées de bovins a été étudiée plus précisément, notamment en fonction du contexte sanitaire, en distinguant les élevages ayant fait l'objet d'un seul et même ADPI de ceux ayant connu plusieurs ADPI sur des périodes différentes. Cette étude a mis en évidence différentes situations. En effet, lors d'un même ADPI, certains bovins ont été trouvés infectés par des souches complètement identiques génétiquement (figure 3A). Tandis que dans d'autres cheptels, des souches éloignées génétiquement ont pu être isolées sur des bovins du même cheptel lors du même ADPI (figure 3B), parfois la même année (cheptels E et F) et parfois des années différentes (cheptel D). Ces données suggèrent qu'un même cheptel pourrait parfois héberger plusieurs souches éloignées génétiquement mais partageant le même génotype (spoligotype-VNTR), et donc probablement avoir fait l'objet de plusieurs contaminations de sources différentes. Finalement, pour les cinq cheptels de notre étude qui avaient fait l'objet de deux ADPI successifs, nos données ont montré que les souches identifiées lors des deux événements étaient éloignées génétiquement (figure 4). Ces résultats suggèrent qu'il ne s'agirait donc pas dans ces cas de résurgences d'une précédente infection mais bien d'une nouvelle infection par une nouvelle souche.

Figure 2

Arbre phylogénétique des 146 souches de *Mycobacterium bovis*. Les différentes couleurs désignent l'espèce animale (A) et les années de collecte (B)

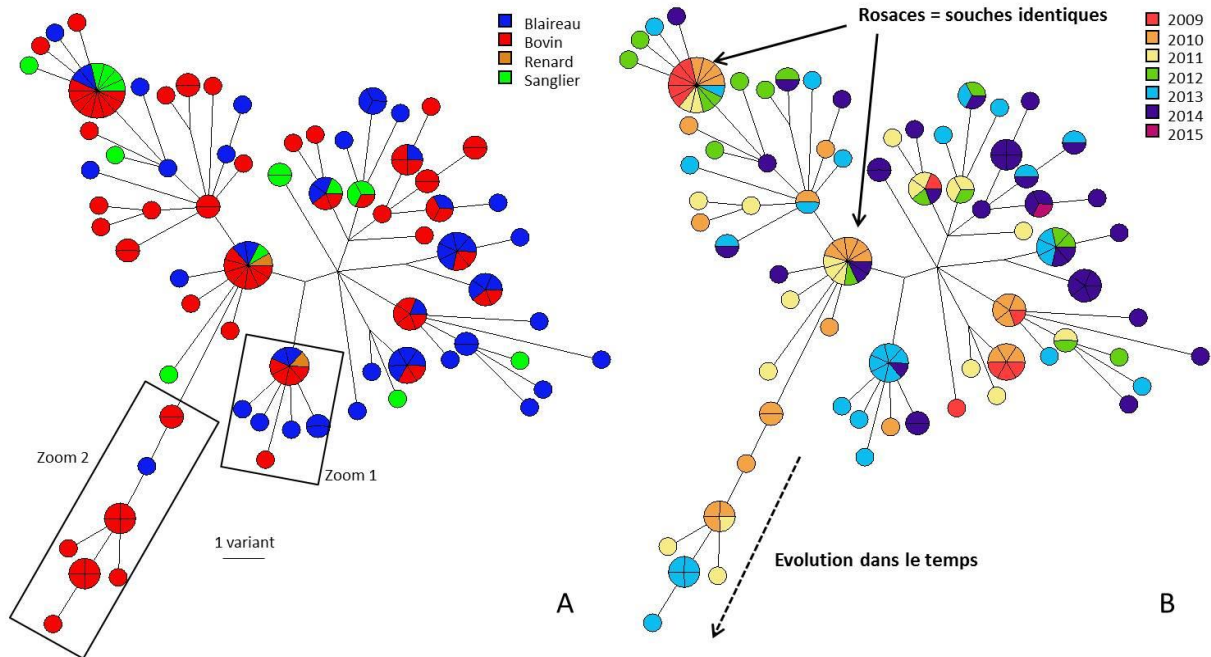


Figure 3

Arbre phylogénétique des 146 souches de *Mycobacterium bovis*. Les couleurs désignent une sélection de souches de même cheptel collectées lors du même APDI, identiques génétiquement (A) ou très éloignées (B).

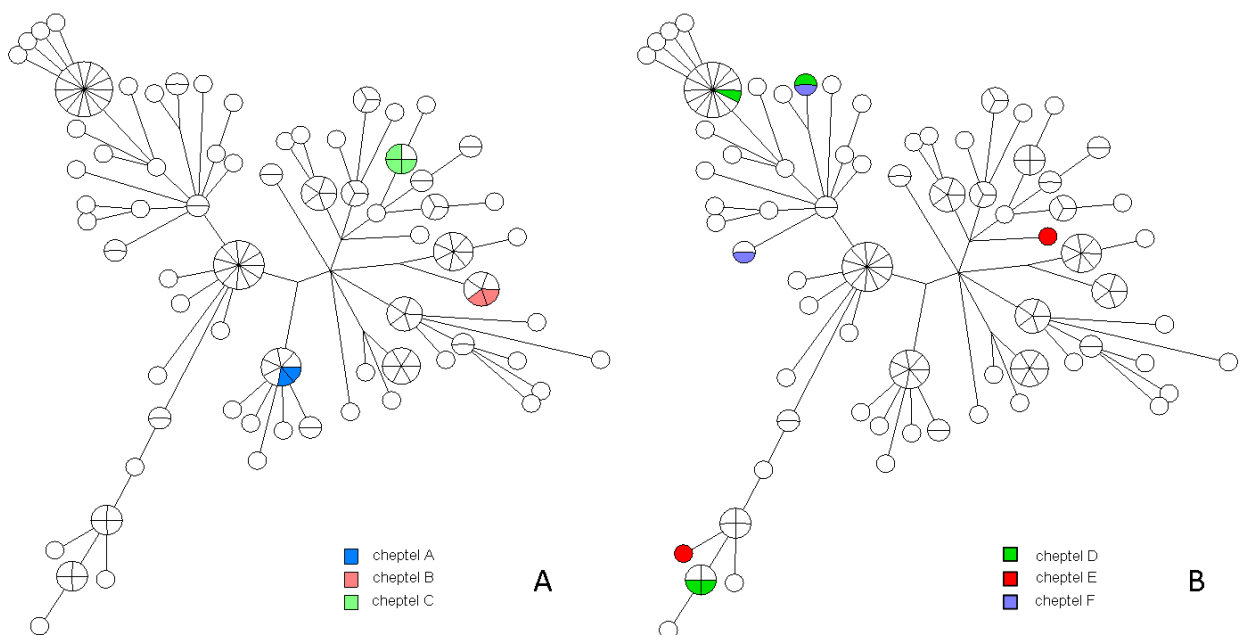
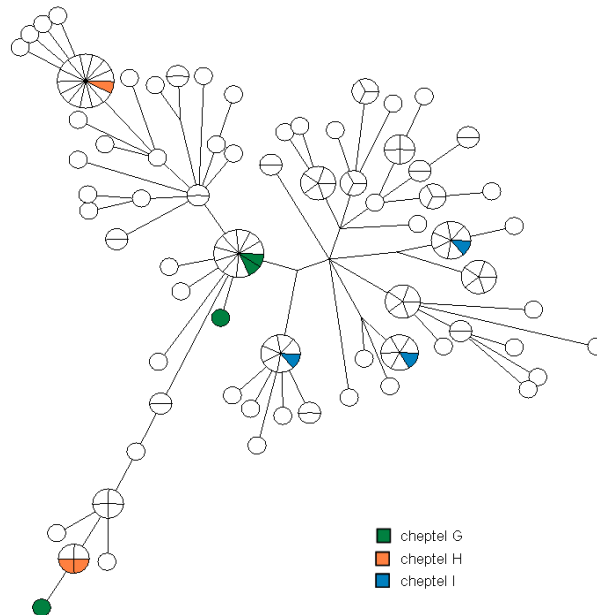


Figure 4

Arbre phylogénétique des 146 souches de *Mycobacterium bovis*.
Les couleurs désignent une sélection de souches de même cheptel collectées lors de différents APDIs.



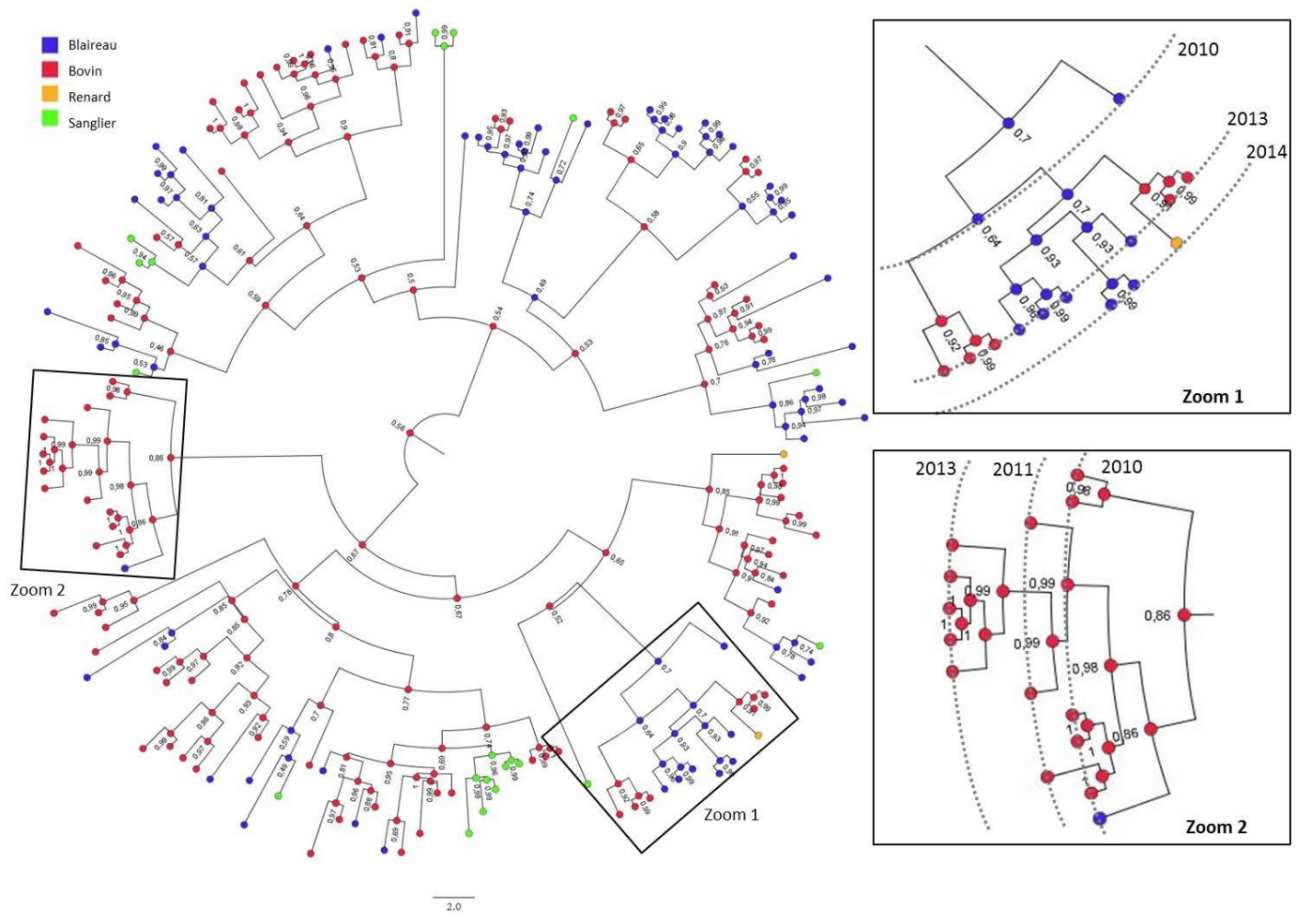
3. INFÉRENCE PHYLOGÉNÉTIQUE

Les analyses de BEAST nous ont permis d'obtenir un arbre phylogénétique tenant compte des données génétiques des souches en y ajoutant une dimension temporelle en considérant les années de collecte, ainsi qu'une dimension de contexte épidémiologique avec l'analyse de l'espèce chez laquelle a été isolée la souche. L'arbre présenté en figure 5 illustre ces résultats en incluant la source d'infection la plus probable à chaque embranchement. La probabilité est indiquée à chaque nœud et varie entre 0,4 et 1. On peut noter que des souches proches isolées chez la même espèce hôte ont une très forte probabilité de descendre d'une souche qui aurait été présente chez cette même espèce. Le zoom 1 met en évidence des souches génétiquement proches (2 variants) isolées chez des blaireaux, des bovins et

un renard entre 2010 et 2014. Le modèle suggère deux événements distincts de contamination des bovins à partir de blaireaux, avec des probabilités de 0,64 et 0,70. Six souches isolées de blaireaux sont quant à elles reliées et seraient issues d'une contamination intra-espèce avec des probabilités allant de 0,93 à 0,99. Le zoom 2 montre des souches isolées de bovins et d'un blaireau entre 2010 et 2013 avec un maximum de quatre mutations. L'analyse des données génétiques seules suggère le passage par un blaireau et une re-contamination des bovins. Le modèle suggère au contraire qu'un bovin serait à l'origine de toutes ces infections avec une probabilité de 0,86. Les nœuds plus extérieurs entre les souches bovines sont soutenus par une probabilité très forte d'une contamination d'origine bovine (>0,98). On remarque également que pour les embranchements les plus profonds de l'arbre, la probabilité devient plus faible.

Figure 5

Arbre du maximum de vraisemblance réalisé avec le logiciel BEAST et mis en forme avec le logiciel Figtree. Chaque rond à l'extrémité d'une branche représente une souche, coloré en fonction de l'espèce animale chez laquelle la souche a été isolée. A chaque nœud de l'arbre, l'espèce animale la plus probable comme source d'infection est identifiée avec la même code couleur ainsi que la probabilité déterminée par l'analyse DATM



IV - DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les premiers résultats de cette étude sont très encourageants. En effet, l'utilisation de la génomique nous a permis de bien différencier des souches clonales de même génotype classique dans une zone de forte incidence de la maladie. Les premières analyses laissent présager la possibilité de différencier une résurgence d'une nouvelle infection (voisinage, introduction d'animaux, prêts de matériel, etc.) d'un cheptel bovin. Afin de conforter cette nouvelle modalité d'investigation, il serait intéressant de soumettre ces résultats à l'échelle du foyer à la DDPP pour confronter avec les données de l'enquête épidémiologique classique.

Nos résultats expliquent et matérialisent concrètement ce qu'on soupçonnait déjà sur la complexité du cycle de transmission. Ils révèlent à nouveau qu'aussi bien faune sauvage que bovins sont importants au niveau local pour la diffusion de la maladie et qu'un cycle de transmission multi-hôtes semble bien établi.

Le principal biais de cette étude est la non exhaustivité de la collection de souches disponibles séquencées et le tirage au sort réalisé pour les bovins. La constitution de la collection du LNR dépend, d'une part, des tests de dépistage, dont l'imperfection ne permet pas de détecter tous les bovins infectés et donc d'isoler toutes les souches impliquées dans les cycles de transmission. D'autre part, un autre biais d'échantillonnage intrinsèque au système de surveillance de la faune sauvage Sylvatub explique le manque d'exhaustivité pour la faune sauvage, conforté par le manque de sensibilité de la bactériologie pour isoler les souches. Quelques maillons dans la chaîne ont certainement échappé aux systèmes de surveillance pouvant induire des erreurs dans nos conclusions. Des données sur un plus grand nombre de souches auraient pu nous permettre des résultats plus fins et plus proches de la réalité. Malheureusement, des contraintes budgétaires liées au coût de la

technique de séquençage nous obligent à restreindre le nombre de souches à inclure dans l'étude.

Ces résultats sont préliminaires et des études plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer quel modèle reflète au mieux la réalité. Pour la suite, il serait intéressant de tester d'autres paramètres sur le logiciel BEAST tels qu'une horloge moléculaire relâchée qui permet de faire varier le taux d'évolution entre les branches et également d'autres modèles de population (par exemple population de taille constante ou croissance exponentielle). Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer le modèle le plus adapté à ce jeu de données et d'estimer le taux de mutation dans cette étude. Le modèle utilisé ici ne prend en compte que les données génétiques, temporelles et l'espèce animale. Il serait intéressant de pouvoir intégrer plus de données épidémiologiques telles que le cheptel d'origine, les données de parcelles, les localisations des animaux de la faune sauvage.

Le développement et l'utilisation d'un modèle mathématique intégrant ces données génétiques en plus des données d'infection spatio-temporelles permettra sans aucun doute d'affiner les résultats et la compréhension du réseau de transmission en Côte-d'Or, *via* notamment l'estimation des taux de transmission intra et inter-espèce(s) afin de permettre la reconstitution de chaînes de transmission.

Ces résultats nous encouragent à élargir cette étude à d'autres zones de France de forte incidence mais avec des contextes épidémiologiques différents de celui de la Côte-d'Or (autres systèmes multi-hôtes, autres pratiques d'élevage, etc.) comme par exemple en Dordogne ou dans les Pyrénées-Atlantiques.

BIBLIOGRAPHIE

Biek R., O'Hare A., Wright D., Mallon T., McCormick C., Orton R.J., McDowell S., Trewby H., Sucke R.A., Kao R.R. - Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of

Mycobacterium bovis in sympatric cattle and badger populations. *PLoS Pathog.*, 2012, 8, e1003008.

- Boschiroli M.L., Michelet L., Hauer A., De Cruz K., Courcou A., Hénault S., Palisson A., Karoui C., Biet F., Zanella G. - Tuberculose bovine en France : cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000-2013. *Bull. Épid. Santé Anim. Alim.*, 2015, **70**, 2-8.
- Bouckaert R., Heled J., Kuhnert D., Vaughan T., Wu C.H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., Drummond A.J. - BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol.*, 2014, **10**, e1003537.
- Cavalerie L., Courcou A., Boschiroli M.L., Réveillaud E., Gay P. - Bovine Tuberculosis in France in 2014: a stable situation. *Bull. Épid. Santé Anim. Alim.*, 2015, **71**, 4-11.
- Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. - Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 2005, **22**, 1185-1192.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. - Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 1985, **22**, 160-174.
- Hauer A., De Cruz K., Cochard T., Godreuil S., Karoui C., Henault S., Bulach T., Banuls A.L., Biet F., Boschiroli M.L. - Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One*, 2015, **10**, e0117103.
- Hauer A., Michelet L., De Cruz K., Cochard T., Branger M., Karoui C., Henault S., Biet F., Boschiroli M.L. - MIRU-VNTR allelic variability depends on *Mycobacterium bovis* clonal group identity. *Infect. Genet. Evol.*, 2016, **45**, 165-169.
- Lemey P., Rambaut A., Drummond A.J., Suchard M.A. - Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol.*, 2009, **5**, e1000520.
- Michelet L., Phalente Y., Karoui C., De Cruz K., Henault S., Boschiroli M.L. - Amélioration dans le diagnostic direct de la tuberculose bovine : la biologie moléculaire à la rescousse de l'histopathologie. *Épidémiol. et santé anim.*, 2016, **70**, 51-58.
- Mollentze N., Nel L.H., Townsend S., le Roux K., Hampson K., Haydon D.T., Soubeyrand S. - A Bayesian approach for inferring the dynamics of partially observed endemic infectious diseases from space-time-genetic data. *Proc. Biol. Sci.*, 2014, **281**, 20133251.
- Roetzer A., Diel R., Kohl T.A., Ruckert C., Nubel U., Blom J., Wirth T., Jaenicke S., Schuback S., Rusch-Gerdes S., Supply P., Kalinowski J., Niemann S. - Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med.*, 2013, **10**, e1001387.
- Skuce R.A., McDowell S.W., Mallon T.R., Luke B., Breadon E.L., Lagan P.L., McCormick C.M., McBride S.H., Pollock J.M. - Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *Vet. Rec.*, 2005, **157**, 501-504.
- Trewby H., Wright D., Breadon E.L., Lycett S.J., Mallon T.R., McCormick C., Johnson P., Orton R.J., Allen A.R., Galbraith J., Herzyk P., Skuce R.A., Biek R., Kao R.R. - Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. *Epidemics*, 2016, **14**, 26-35.
- Turankar R.P., Lavania M., Chaitanya V.S., Sengupta U., Darlong J., Darlong F., Siva Sai K.S., Jadhav R.S. - Single nucleotide polymorphism-based molecular typing of *M. leprae* from multicase families of leprosy patients and their surroundings to understand the transmission of leprosy. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, **20**, 0142-0149.
- Zhang J., Abadia E., Refregier G., Tafaj S., Boschiroli 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**, 285-294.

