

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE D'ALGER (ENSV)



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Typage moléculaire des mycobactéries responsables de la tuberculose bovine dans quelques abattoirs d'Alger

Présenté par : M^{lle} Faïza BELAKEHAL

Soutenu publiquement le : 28/03/2022

Devant le jury composé de :

BOUKHORS K.T (ENSV, Alger)	Président	Professeur
NAIM. M (CHU El Kettar, Alger)	Promoteur	Professeur
HAMDI. TM (ENSV, Alger)	Co-Promoteur	Professeur
YALA. D (CHU Béni Messous, Alger)	Examineur 1	Professeur
SAHRAOULN (Univ Blida, Saad Dahlab 1)	Examineur 2	Professeur
AZZAG. N (ENSV, Alger)	Examineur 3	Professeur
MOSER. I (FLI-IMP, Allemagne)	Invité d'honneur	Docteur

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers au monde, mes très chers parents Monsieur et Madame BELAKEHAL, que Dieu leur donne la santé et longue vie InchAllah.

A mes chers frangins, frangines, mes nièces et mes neveux.

A tous ceux qui m'ont encouragé et cru en moi jusqu'au dernier souffle : mes proches, mes amis, mes consœurs et confrères.

Remerciements

Je remercie mon Directeur de thèse : **Monsieur le Professeur NAIM M**, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour m'avoir encouragée à travailler sur la tuberculose bovine et humaine.

Je tiens à présenter toute ma gratitude et mon respect à mon co-directeur de thèse : **Monsieur le Professeur HAMDI T. Mossadak**, avec qui le parcours a été long mais tellement agréable, riche et motivant. Je le remercie pour le temps qu'il m'a consacré pour avoir dirigé le présent travail de recherche, je le remercie pour sa présence et ses encouragements incessants, pour sa rigueur et sa persévérance déployés pour les corrections et l'amélioration du présent manuscrit, ainsi que pour son soutien moral tout au long de mon parcours universitaire jusqu'à ce jour. UN GRAND MERCI A VOUS.

Tout mon respect et mes remerciements vont vers les membres du jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail et d'apporter les corrections nécessaires afin de l'améliorer et le mettre à disposition du lecteur un document scientifique intéressant, riche et propre. Toute ma gratitude à **Madame le Professeur BOUKHORS T. Karima** qui a accepté de présider ce jury, merci à **Madame le Professeur AZZAG Naouel** pour m'avoir fait l'honneur de lire mon document. Je remercie **Madame le Professeur SAHRAOUI Naima** et **Monsieur le Professeur YALA Djamel** qui m'ont fait honneur par leur présence parmi le jury de thèse. Je vous remercie d'avoir pris la responsabilité de juger mon travail.

Je tiens à remercier profondément toute l'équipe de l'institut Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)/Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis (IMP), National Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Jena-Allemagne.

Madame le Docteur MOSER Irmgard, je vous remercie du fond du cœur pour m'avoir donnée la chance de pratiquer un stage au laboratoire de biologie moléculaire et de pouvoir par la suite réaliser une bonne partie de mon travail de thèse dans votre laboratoire, ce qui m'a permis de publier mon travail de recherche. Ce fut une expérience juste magnifique ! Je vous remercie pour votre accueil chaleureux, je vous remercie pour l'encadrement durant mon stage, pour votre présence et votre soutien.

Je remercie particulièrement **Madame le Docteur Barth A. Stephanie** du laboratoire FLI-IMP (Jena-Allemagne), pour son accueil chaleureux, pour sa collaboration dans ce travail, je vous remercie aussi pour le temps consacré au travail à distance.

Je présente mes sincères remerciements aux techniciennes du laboratoire FLI-IMP (Jena-Allemagne) : **Josefine Bach** et **Uta Brommer** pour leur soutien dans la réalisation des méthodes moléculaires, sans oublier **Sandy**.

Je tiens également à remercier chaleureusement le Directeur de l'institut Friedrich-Loeffler-Institut (Jena-Allemagne): **Prof. Dr. Christian MENGE** ainsi que le président de l'institut Friedrich-Loeffler-Institut (Jena-Allemagne) : **Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. METTENLEITER** pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser la partie pratique de ce travail au sein du FLI-IMP.

Je tiens à remercier vivement les vétérinaires des abattoirs d'El-Harrach, d'Hussein Dey, de Hadjout et de Dellys : **Dr SEYAD F, Dr BOUSSAKSSOU H, Dr HAOUASSINE R, Docteur ISMAIL S, Dr BAKA A, Dr KOUIDRI A** et **Dr EL FARCI S**, pour leur excellent support durant la réalisation des prélèvements.

Je remercie vivement **Monsieur ADJOU Mustapha** de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance au **Docteur BOUZENAD Amel** de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour son aide précieuse.

Je tiens à présenter mes remerciements les plus sincères à mes très chères enseignantes du module d'embryologie **Madame SAADI Habiba** et du module de génétique **Madame SMAI Amina**, pour leur soutien, leurs encouragements incessants depuis la première année de graduation à l'ENSV jusqu'à ce jour.

Je remercie vivement **Madame ZENIA Safia** pour l'analyse statistique pour tout ce que vous avez fait pour moi, je remercie aussi **Madame HAMDI Fouzia**, pour sa contribution en matière de correction de la langue anglaise de l'article mais aussi pour ses encouragements.

Je remercie infiniment **Monsieur BOUKARA Youssef** du service de la DPGR de l'ENSV, pour sa patience, son soutien, sa gentillesse et sa compréhension.

Je remercie **Yacine, Wassila Chouarfia, Meriem** et **Yousef** de la bibliothèque de l'ENSV ainsi que tout le personnel de la bibliothèque de l'ENSV sans oublier la Directrice de la bibliothèque de l'ENSV.

Abstract

Bovine tuberculosis (BT) caused by *M. bovis* and *M. caprae* is a transmissible disease of livestock with high economic consequences and notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE). To estimate the prevalence and risk factors associated to BT and elucidate the propagation route, a study was conducted in Algerian abattoirs during the period of 2013-2017, involving detailed inspection, microscopic examination, culture of tissue samples and molecular investigation. Out of 3848 bovine carcasses examined, 184 (4.78%) exhibit visible lesions suggestive of tuberculosis. Anatomically 84.8% of the lesions were found in thoracic cavity. Lesions were predominant in tracheobronchial lymph nodes (71.7%), lung tissue (4.9%) and retropharyngeal lymph nodes (4.9%), followed by hepatic tissue and associated lymph nodes (7.6%). Less frequently, lesions were observed in prescapular lymph nodes (1.6%), digestive tract (0.5%) and kidney (0.5%). The study revealed statistically high ($p < 0.0001$) infection rate in males (78.8%) than females (21.2%). A Significant difference ($p < 0.05$) in tuberculosis infection rate was recorded between the three age animal categories: 2 to 6 years (42.9%), < 2 years (39.1%) and ≥ 6 years (17.9%). Analysis of data recorded in the present study showed a high significant variation ($p < 0.0001$) in seasonal prevalence of BT with a higher frequency during dry season than in rainy season. Microscopic examination of 105 samples revealed that 60 (57.1%) harbored acid-fast-bacilli (AFB) and 45(42.9%) were negative ($p > 0.05$). Culture yielded 60 (57.1%) positive, 43(41%) negative and only 2(1.9%) samples were contaminated. In PCR RD9 analysis, all isolated strains were belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). In order to better understand the route of spreading, characterization of mycobacteria has been performed. Sixty strains have been analyzed by spoligotyping, thereof 42 by 19-locus-MIRU-VNTR-typing. Spoligotyping revealed 16 distinguishable patterns (HGDI=0.8294), with types SB0120 ($n = 20$) and SB0121 ($n = 13$) being the most frequent patterns, representing 55% of the strains. Analyses based on 19-locus-MIRU-VNTR yielded 32 different profiles, five clusters and one orphan pattern, showing higher discriminatory power (HGDI = 0.9779) than spoligotyping. Seven VNTR-loci [VNTR 577 (alias ETR C), 2163b (QU11b), 2165 (ETR A), 2461 (ETR B), 3007 (MIRU 27), 2163a (QUB11a) and 3232 (QUB 3232)] were the most discriminative loci (HGDI > 0.50). In conclusion, 19-locus-MIRU-VNTR yielded more information than spoligotyping concerning molecular differentiation of strains and better supports the elucidation of transmission routes of *M. bovis* between Algerian cattle herds. The present findings can serve as background information to elaborate an adequate eradication program for BT in Algeria.

Key words: bovine tuberculosis, lesions, slaughterhouses, prevalence, risk factor, Algeria, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, molecular characterization, spoligotyping, MIRU-VNTR-typing, cattle.

Résumé

La tuberculose bovine (TB) causée par *M. bovis* et *M. caprae* est une maladie transmissible du bétail ayant des conséquences économiques considérables et notifiée à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). Afin d'estimer la prévalence et les facteurs de risque associés à la TB et pour mieux comprendre les voies de propagation, une étude a été menée dans quelques abattoirs algériens durant la période 2013-2017, incluant l'inspection des carcasses bovines, la culture et l'examen microscopique d'échantillons de tissus ainsi qu'une analyse par caractérisation moléculaire des souches isolées. Sur les 3848 carcasses bovines examinées, 184 (4,78%) présentaient des lésions visibles suspectes de TB. 84,8% des lésions sont observées dans la cavité thoracique. Les lésions sont prédominantes dans les ganglions lymphatiques trachéobronchiques (71,7%), le tissu pulmonaire (4,9%), les ganglions lymphatiques rétropharyngés (4,9%), le tissu hépatique et les ganglions lymphatiques associés (7,6%). Elles sont moins fréquentes, dans les ganglions lymphatiques préscapulaires (1,6%), le tube digestif (0,5%) et les reins (0,5 %). Nos résultats ont révélé un taux d'infection plus élevé ($p < 0,0001$) chez les mâles (78,8%) que chez les femelles (21,2%). Une différence significative ($p < 0,05$) du taux d'infection est enregistrée entre les trois catégories d'âge : 2 à 6 ans (42,9%), < 2 ans (39,1%) et ≥ 6 ans (17,9%). L'analyse des données enregistrées montre une variation saisonnière significative ($p < 0,0001$) de la prévalence de la TB avec une fréquence plus élevée durant la saison sèche par rapport à la saison humide. L'examen microscopique de 105 échantillons a révélé que 60 (57,1%) hébergeaient des BAAR et 45 (42,9%) étaient négatifs ($p > 0,05$). La culture a révélé 60 (57,1%) échantillons positifs, 43 (41%) négatifs et seulement 2 (1,9%) échantillons contaminés. Selon, l'analyse par PCR-RD9, toutes les souches isolées appartenaient au CMT. Soixante souches ont été caractérisées par spoligotypage, dont 42 par 19 locus MIRU-VNTR. Le spoligotypage a révélé 16 profils distincts (HGDI=0,8294), les types SB0120 ($n = 20$) et SB0121 ($n = 13$) étant les profils les plus fréquents, représentant 55 % des souches analysées. Les analyses basées sur le typage 19 locus MIRU-VNTR ont révélé la présence de 32 profils différents, cinq clusters et un profil orphelin, indiquant un pouvoir discriminatoire plus élevé (HGDI = 0,9779) que le spoligotypage. Sept loci VNTR [VNTR 577 (alias ETR C), 2163b (QU11b), 2165 (ETR A), 2461 (ETR B), 3007 (MIRU 27), 2163a (QUB11a) et 3232 (QUB 3232)] sont les plus discriminants (HGDI $> 0,50$). En conclusion, les 19 loci MIRU-VNTR ont révélé plus d'informations que le spoligotypage concernant la différenciation moléculaire des souches et facilite mieux l'élucidation des voies de transmission de *M. bovis* dans les troupeaux de bovins algériens. Les présents résultats peuvent servir d'informations de base pour élaborer un programme d'éradication adéquat de la TB en Algérie.

Mots clés : tuberculose bovine, lésions, abattoirs, prévalence, facteur de risque, Algérie, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, caractérisation moléculaire, spoligotyping, typage MIRU-VNTR, bovins.

ملخص:

مرض السل عند الأبقار الذي تسببه بكتيريا عصيات السل البقرية و الماعزية هو مرض معد يصيب الماشية وله عواقب اقتصادية كبيرة ويتم إخطاره بالمنظمة العالمية للصحة الحيوانية (م ع ص ح) .

من أجل فهم بشكل أفضل لمدى و طرق إنتشار هذا المرض و تقدير عوامل الخطر المرتبطة به، تم إجراء دراسة في بعض المسالخ الجزائرية خلال الفترة من 2013 إلى 2017 بما في ذلك فحص الأبقار بعد الذبح ، عزل البكتيريا والفحص المجهرى لعينات الأنسجة وكذلك التوصيف الجزيئي للحمض النووي للبكتيريا. من بين 3848 ذبيحة بقر تم فحصها ، وجدنا لدى 184 (4.78%) أضرار مرئية يشتبه في إصابتها بمرض السل. من الناحية التشريحية ، لوحظت 84.8% من الأضرار في التجويف الصدري. الأضرار سائدة في العقد اللمفاوية الرغامية القصبية (71.7%) ، ونسيج الرئة (4.9%) ، و العقد اللمفاوية خلف البلعوم (4.9%) ، تليها أنسجة الكبد والعقد اللمفاوية المرتبطة بها (7.6%). أقل شيوعاً ، شوهدت الآفات في العقد اللمفاوية للكثف (1.6%) والجهاز الهضمي (0.5%) والكلية (0.5%). أظهرت نتائجنا ارتفاع معدل الإصابة ($p < 0.0001$) عند الذكور (78.8%) مقارنة بالإناث (21.2%). تم تسجيل فرق معتبر ($p < 0.05$) في معدل الإصابة بين الفئات العمرية الثلاث: 2-6 سنوات (42.9%) ، أقل من سنتين (39.1%) و 6 سنوات (17.9%). يُظهر تحليل البيانات المسجلة إختلافاً موسميًا كبيراً ($p < 0.0001$) في إنتشار مرض السل مع تسجيل إرتفاع ملحوظ خلال موسم الجفاف مقارنة بالموسم الرطب. كشف الفحص المجهرى لـ 105 عينة أن 60 (57.1%) تحتوي على عصيات مقاومة للحمض (ع م ح) و 45 (42.9%) كانت سلبية ($p > 0.05$). كشفت نتائج العزل المخبري للبكتيريا عن 60 (57.1%) عينة إيجابية ، 43 (41%) عينة سلبية وعينتان فقط (1.9%) ملوثة. وفقاً لتحليل الحمض النووي للبكتيريا بطريقة تفقد تفاعل إنزيمات منطقة اختلاف 9 ، فإن جميع السلالات المعزولة تنتمي إلى معقد المتفطرات السلية (م م س).

تم تمييز 60 سلالة بواسطة طريقة تنميط بنية الموضع المتكرر المباشر للجينوم ، بما في ذلك 42 بواسطة طريقة تنميط الوحدة المتكررة المتناثرة السلية-عدد متغير من التكرارات الترادفية-19.

كشفت طريقة تنميط بنية الموضع المتكرر المباشر عن 16 صنف مختلف (مؤشر هنترجاستون التمييزي م ه ج ت = 0.8294) ، الأصناف 0120 (ن = 20) و 0121 (ن = 13) هي الأكثر شيوعاً و تمثل نسبة 55% من السلالات التي تم تحليلها. تبين نتائج تحاليل الوحدة المتكررة المتناثرة السلية-عدد متغير من التكرارات الترادفية-19 الى وجود 32 صنف مختلف ، خمس أصناف متطابقة ونوع واحد غير مصنف ، مما يشير إلى قوة تمييزية أعلى (م ه ج ت = 0.9779) مقارنة بطريقة بنية الموضع المتكرر المباشر. سبعة مواقع علي الجينوم البكتيري 577، 2163، 2165، 2461، 3007، 2163 أ ، و 3232 أوضحت أعلى قدرة في التمييز بين السلالات (م ه ج ت > 0.50). في الختام كشف التنميط بطريقة الوحدة المتكررة المتناثرة السلية-عدد متغير من التكرارات الترادفية-19 عن معلومات أكثر من التنميط بطريقة بنية الموضع المتكرر المباشر للجينوم فيما يتعلق بالتمايز الجزيئي للسلالات ويسهل بشكل أفضل توضيح مسارات انتقال عصيات السل البقرية في قطاع الماشية الجزائرية . يمكن أن تكون النتائج الحالية بمثابة معلومات أساسية لتطوير برنامج مناسب للسيطرة على مرض السل البقري في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: السل البقري ، أضرار ، المسالخ ،نسبة الانتشار ، عامل الخطر ، الجزائر ، عصيات السل البقرية ، عصيات السل الماعزية ، التوصيف الجزيئي ، بنية الموضع المتكرر المباشر للجينوم ، الوحدة المتكررة المتناثرة السلية-عدد متغير من التكرارات الترادفية-19، الماشية.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

<u>CHAPITRE I : Généralités sur les mycobactéries</u>	3
--	----------

I.1 Phylogénie	3
I.2 Morphologie et structure des mycobactéries	5
I.3 Caractères généraux	5
I.4 Classification des mycobactéries.....	6
I.5 Description génomique.....	10
I.6 Caractéristiques génétiques.....	11

<u>CHAPITRE II : La tuberculose bovine</u>	12
---	-----------

II.1 Epidémiologie.....	12
--------------------------------	-----------

II.1.1 Distribution géographique	12
II.1.2 Facteurs de risques.....	13
II.1.3 Sources d'infection et mode de transmission	16
II.1.4 Pathogénèse	16

II.2 Diagnostic de la tuberculose bovine	17
---	-----------

II.2.1 Diagnostic ante mortem.....	17
---	-----------

a. Manifestations cliniques	17
b. Dépistage par tuberculation	18
c. Dosage de l'interféron gamma (IFN- γ)	19
d. Sérodiagnostic	19

II.2.2 Diagnostic post mortem.....	20
---	-----------

A/Diagnostic lésionnel à l'abattoir	20
---	----

B/Diagnostic de laboratoire	21
-----------------------------------	----

1. Examen bactérioscopique.....	21
2. Culture et l'identification biochimique	21
3. Identification et caractérisation moléculaire	24
a. Etude des régions de différences (RD)	24
b. Typage par technique RFLP-IS6110	25
c. Le spoligotypage.....	26
d. Typage par MIRU-VNTR.....	28

e. Séquençage génomique	30
f. Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)	31
g. Puces à ADN (Microarrays).....	31
II.3 Risque zoonotique lié à <i>M. bovis</i>.....	31
II.3.1 Facteurs de risques de l'infection zoonotique	32
II.3.2 Mode de transmission de l'infection zoonotique.....	33
II.4 Surveillance et lutte contre la tuberculose bovine	34
II.4.1 Mesures offensives	34
II.4.2 Mesures défensives	34
II.4.3 Le concept « One Health »	35

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Objectifs de l'étude.....	37
I. Matériels et méthodes	37
I.1 Matériel	37
I.2 Méthodes	39
I.2.1 Zone de collecte et lieu de l'étude.....	39
I.2.2 Inspection vétérinaire post mortem et prises de prélèvements	40
I.2.3 Mesures générales de précaution	41
I.2.4 Traitement des échantillons et mise en culture.....	42
a. Décontamination des prélèvements	42
b. Examen microscopique direct	43
c. Culture des mycobactéries	44
d. Contrôle de l'aspect et de la pureté des colonies.....	45
I.2.5 Caractérisation moléculaire des isolats.....	45
A/ Identification des souches par PCR-RD9.....	45
a. Extraction d'ADN.....	45
b. Préparation du Mix PCR.....	46
c. Amplification d'ADN	47
d. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	48
B/Typage moléculaire des isolats de <i>M. bovis</i>	49
a. Extraction d'ADN.....	49
b. Typage moléculaire par spoligotypage	51
➤ Préparation du mix PCR (DRa/DRb)	52

➤ Amplification des régions DR 5' -biotinylés	53
➤ Hybridation	53
c. Acquisition des résultats de spoligotypage	55
d. Typage moléculaire par 19 loci MIRU-VNTR	57
➤ Préparation du Mix PCR.....	58
➤ Amplification et électrophorèse des produits PCR	58
e. Lecture et interprétation des résultats de MIRU-VNTR.....	59
I.2.6 Analyse statistique et génomique des résultats.....	59
II. Résultats.....	60
II.1. Prévalence de la tuberculose bovine dans les abattoirs d'étude	60
II.1.1 Prévalence globale.....	60
II.1.2 Prévalence par abattoir	60
II.2 Prévalence de la tuberculose bovine selon les facteurs de risques	66
II.3 Culture des mycobactéries et examen microscopique.....	69
II.4 Résultat de l'identification moléculaire par PCR-RD9.....	74
II.5 Résultats du typage moléculaire	75
II.5.1 Résultat du spoligotypage	75
II.5.2 Résultats du typage par 19 loci MIRU-VNTR	80
Discussion.....	91
Conclusion	105
Perspectives.....	106
Références bibliographiques	
Annexes	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Taxonomie des mycobactéries.....	3
Tableau 2 : Classification des mycobactéries non tuberculeuses	7
Tableau 3 : Classification de quelques espèces de mycobactéries selon leur écologie et leur pouvoir pathogène	8
Tableau 4 : Tailles génomiques et nombre de gènes de quelques espèces de mycobactéries entièrement séquencées.	10
Tableau 5 : Caractères d'identification biochimique des principales mycobactéries	23
Tableau 6 : Nombre de carcasses bovines inspectées et nombre de prélèvements collectés et analysés par abattoir.	41
Tableau 7 : Tailles des produits PCR-RD9 et les amorces utilisées pour l'identification des souches isolées	46
Tableau 8 : Composition du mélange réactionnelle de la PCR-RD9.....	47
Tableau 9 : Préparation du mélange réactionnel de la PCR DRa/DRb	52
Tableau 10 : Liste des 19 locus évalués pour le typage de <i>M.bovis</i> et les amorces correspondantes.....	57
Tableau 11 : Réactifs et volumes utilisés pour le mélange réactionnel de la PCR pour la technique MIRU-VNTR	58
Tableau 12 : Prévalence globale des lésions suspectes de tuberculose bovine	60
Tableau 13 : Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine par abattoir	61
Tableau 14 : Principales localisations des lésions suspectes de tuberculose bovine dans la carcasse	63
Tableau 15: Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'organe et les nœuds lymphatique atteints	64
Tableau 16 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon le sexe de l'animal	66
Tableau 17 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'âge de l'animal	67
Tableau 18: Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon la saison.....	68
Tableau 19 : Nombre de prélèvements positifs par examen microscopique	69
Tableau 20 : Nombre de prélèvements positifs par culture sur milieu de Löwenstein-Jensen	70

Tableau 21 : Nombre de prélèvements positifs et négatifs après examen microscopique et culture	69
Tableau 22 : Bacilloscopies positives et négatives à partir des cultures positives	73
Tableau 23 : Résultats de l'identification de l'espèce des souches isolées par spoligotypage.....	75
Tableau 24 : Profils de spoligotypes de <i>M. bovis</i> (n=59) et <i>M. caprae</i> (n=1) et leurs fréquences relatives	76
Tableau 25 : Diversité allélique des 10 loci MIRU-VNTR analysés recommandés dans le site web MIRU-VNTR plus	82
Tableau 26 : Diversité allélique des 9 loci MIRU-VNTR analysés recommandés pour le typage du <i>M.bovis</i>	83
Tableau 27 : Profils VNTR des souches de <i>M. bovis</i> obtenu par combinaison du spoligotypage et de 19 loci MIRU-VNTR	85
Tableau 28 : Comparaison du pouvoir discriminant du spoligotypage, du typage par 19 loci MIRU-VNTR et de la combinaison des deux méthodes	87

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du génome de <i>M. bovis</i>	11
Figure 2 : Distribution globale de la tuberculose en 2017 et durant le premier semestre 2018.....	13
Figure 3 : Principaux facteurs de risque de transmission de la tuberculose bovine.....	15
Figure 4 : Phylogénie des souches de CMT basée sur les régions de différence et les SNPs	25
Figure 5 : Principe de la technique de spoligotypage.....	27
Figure 6 : Schéma des principales étapes de la détection du polymorphisme génétique par la technique MIRU-VNTR	29
Figure 7 : Principaux modes de transmission de <i>M. bovis</i> entre les animaux et l'homme	33
Figure 8 : Diagramme du plan de travail expérimental	40
Figure 9: Inspection d'un foie de bovin présentant des lésions suspectes de tuberculose	41
Figure 10 : Préparation du prélèvement pour le traitement au laboratoire	42
Figure 11 : Broyage et décontamination du prélèvement.....	43
Figure 12 : Coloration des frottis par la méthode de Ziehl- Neelsen	44
Figure 13 : Préparation des suspensions bactériennes pour l'extraction d'ADN	46
Figure 14 : Préparation du Mix PCR-RD9 et mélange avec les échantillons d'ADN	47
Figure 15: Electrophorèse des produits d'amplification sur gel d'agarose	48
Figure 16 : Visualisation du gel d'agarose avec le transilluminateur à UV	48
Figure 17: Extraction d'ADN	50
Figure 18: Quantification d'ADN par Nanodrop	50
Figure 19: Système microarrays utilisé sur barrettes (Array-strip) (a) Le cercle blanc montre une image agrandie de la puce fixée au fond de chaque puits de la barrette (b).	51
Figure 20 : Schéma représentatif du principe de microarrays (ArrayStrip)	52
Figure 21 : Visualisation des produits d'amplification des ADN biotinylés.....	53
Figure 22 : Hybridation des produits PCR	54
Figure 23 : Incubation des échantillons dans l'agitateur thermostaté	55
Figure 24 : Lecture des résultats de spoligotypage (Microarrays) par l'ArrayMate™	56
Figure 25 : Prévalence globale des lésions suspectes de tuberculose bovine	60
Figure 26 : Nombre de carcasses bovines examinées dans chaque abattoir	61
Figure 27 : Pourcentages de lésions suspectes de tuberculose bovine par abattoir	62
Figure 28: Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine par abattoir.....	62

Figure 29 : Prévalence des principales localisations des lésions suspectes de tuberculose bovine dans la carcasse	63
Figure 30 : Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'organe et les nœuds lymphatique atteints.....	65
Figure 31 : Lésions tuberculeuses dans la cavité thoracique d'un bovin	65
Figure 32 : Lésions de tuberculose bovine dans le ganglion lymphatique trachéobronchique	66
Figure 33 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon le sexe de l'animal	67
Figure 34 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'âge de l'animal	68
Figure 35 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon la saison	68
Figure 36 : Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'examen microscopique	69
Figure 37 : Microscopie positive montrant des BAAR en forme de coccobacilles	70
Figure 38 : Prévalence de la tuberculose bovine selon les résultats de la culture sur milieu de Löwenstein-Jensen	71
Figure 39 : Aspect des cultures positives de <i>M.bovis</i> sur milieu de Löwenstein-Jensen	71
Figure 40: Nombre de prélèvements positifs et négatifs selon l'examen microscopique (B) et la culture (C)	72
Figure 41 : Pourcentage des bacilloscopies positives et négatives à partir des 60 prélèvements positifs par cultures	73
Figure 42: Résultats de la PCR-RD9 de 13 isolats de mycobactéries.....	74
Figure 43 : Prévalence des espèces de mycobactéries isolées responsables des lésions de tuberculose bovine.....	75
Figure 44 : Spoligotypes des souches de <i>M. bovis</i> et <i>M. caprae</i> identifiés dans le présent travail.	78
Figure 45 : Profil des spoligotypes des souches de <i>M. bovis</i> (n=42) isolés dans le présent travail	79
Figure 46: Visualisation des produits PCR du loci 2165 (ETR A).....	80
Figure 47 : Visualisation des produits PCR du loci 802 (MIRU40).....	81
Figure 48 : Diversité allélique (HGDI) de 19 loci MIRU-VNTR obtenu pour les souches de <i>M.bovis</i>	84
Figure 49 : Fréquence des profils VNTR correspondant à chaque spoligotype	86

Figure 50 : Indice de discrimination (HGDI) du spoligotypage, du typage par 19 loci MIRU-VNTR et de la combinaison des deux techniques.	88
Figure 51 : Fréquences des profils individuels et regroupés selon la technique de typage moléculaire.....	88
Figure 52: Arbre génétique des souches de <i>M. bovis</i> (n=42) obtenu par la combinaison des profils du spoligotypage et des MIRU-VNTR (BioNumerics, version 7.6.2).....	89

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique
ARN: Acide ribonucléique
ARNr 16S : ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes
ATCC: American type culture collection
BAAR: Bacilles acido-alcool-résistants
BCG: Bacille Calmette et Guérin
BCS : Body condition scoring
CFP10 : Culture filtrate protein 10 kDa
CMA: Complexe *mycobacterium avium*
CMI : Immunité à médiation cellulaire
CMT: Complexe *mycobacterium tuberculosis*
dNTP: Désoxyribonucléoside triphosphate
DR: Direct repeat
DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA (TAE) : Acide éthylène diamine tétra-acétique (Tris Acétate EDTA)
EFSA: European Food Safety Authority
ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ESAT6: Early Secreted Antigenic Target 6kD
ETR: Exact Tandem Repeat
EU-RL: European Union Reference Laboratory
Ex: Exemple
F: Forward primer
FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
GmbH: Gesellschaft mit beschränkter Haftung (Société allemande)
HGDI: Hunter-Gaston- Discriminatory Index
HPC: Chlorure d'hexadécylpyridinium
HRP: Horseradish peroxidase (peroxydase de raifort)
hsp65: Heat-shock protein 65
IC : Intervalle de confiance
IFN- γ : Interféron gamma
Inc : Inconnu
IS6110: Insertion Sequence 6110
JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

M: Mycobacterium

MAPIA: Multi-Antigen Print Immuno Assay

MIRU-VNTR: Mycobacterial Interspered Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeat

MLVA: Multi Locus VNTR Analysis

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses

MPB70: Protéines majeures de 70 kDa sécrétées par les bactéries du CMT

MPB83 : Protéines majeures de 83 kDa sécrétées par les bactéries du CMT

n : Nombre d'échantillon/Nombre de souches

NaOH: Hydroxide de sodium

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NGS: Next Generation Sequencing

NL : Nœuds lymphatique

Nb: Nombre

OIE: Organisation mondiale de la Santé animale (ex Office international des épizooties)

OMS: Organisation mondiale de la santé

PAS: Acide para-aminosalicylique

pb: Paire de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

PGM: Ion Personal Genome Machine

PPD-A: Avian purified protein derivatives

PPD-B: Bovine purified protein derivatives

QUB: Queen's University Belfast

R: Reverse primer

RD: Régions de différences

rpm: Revolutions per minute of rotor

SIT: Spoligotyping International Type

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SNPs: Pluriel de SNP

SpolDB4: The fourth international spoligotyping database

ssp: Subspecies

TbD1: M. tuberculosis specific deletion 1

TCH: Hydrazide de l'acide thiophène carboxylique

USA: United States of America

UV: Ultraviolet

V: Volt

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

WAHIS: World Animal Health Information System

WGS: Whole Genome Sequencing

WHO: World Health Organization

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des solutions pour la coloration de Ziehl-Neelsen.

Annexe 2 : Composition du milieu de Löwenstein-Jensen.

Annexe 3: Kit for isolation of nucleic acids for PCR and Southern blotting (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Life Science, USA). Version 20, October 2012, Cat. n° 11796828001.

Annexe 4: Kit hybridisation and detection components Alere technologies, Cat. 245200100.

Annexe 5 : Interprétation des résultats de spoligotyping sur microarrays par l'Array MateTM.

Annexe 6 : Composition des différents panels utilisés pour le typage MIRU-VNTR.

Annexe 7 : Composition du panel de 9 loci MIRU-VNTR recommandé par le Centre Européen de référence pour la tuberculose bovine, Centre de surveillance de la santé VISAVET, Université Complutense de Madrid.

Annexe 8 : Grille utilisée pour la détermination du nombre de copies MIRU-VNTR dans chaque locus en fonction de la taille des bandes.

Introduction

La tuberculose est une maladie ancienne, découverte dans des reliques d'Égypte anciennes, d'Inde et de Chine. **Gutierrez et al. (2005)** ont pensé qu'il était probable qu'un ancien ancêtre de *Mycobacterium (M) tuberculosis* était présent il y a environ 3 millions d'années en Afrique de l'Est, ils ont suggéré qu'il aurait pu infecter les grands singes et l'homme ancestral de l'époque (**Good et al., 2018**). C'est en 1882 que Robert Koch publie son journal « Die Actiologie der Tuberkulose » dans lequel il décrit l'isolement de l'agent causal à partir de prélèvements humains et animal. Son nom générique signifiant bactérie fongique fait allusion à sa croissance en milieu liquide faisant rappeler celle d'un champignon (**Grange et Collins, 1997**).

La tuberculose bovine est une maladie à déclaration obligatoire en Algérie (**JORA, 2006**). Elle est définie comme étant une maladie infectieuse chronique causée par l'une des trois espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) : *M. bovis*, *M. caprae* et *M. tuberculosis* (**OIE, 2021**). Elle revêt un impact économique certain (**Allen et al., 2018**), elle a également de graves conséquences sur la biodiversité et la santé publique (**Roex et al., 2013**). Elle a aussi des conséquences néfastes sur la santé et le bien-être de l'animal, ainsi que sur la productivité, rendant les carcasses impropres à la consommation. La tuberculose bovine crée également des obstacles au commerce international d'animaux et produits d'origine animale (**Dean et al., 2018**). La tuberculose bovine est classée en tête de liste des zoonoses majeures par l'OMS, la FAO et l'OIE. C'est une zoonose négligée particulièrement dans les pays en voie de développement (**Michel et al., 2010**). En 2016, l'OMS estime qu'il y avait 147.000 nouveaux cas de tuberculose zoonotique chez l'homme et 12.500 décès dus à la maladie (**WHO et al., 2018**).

Plusieurs hypothèses de transmission de la maladie ont été formulées parmi les quelles : les mesures de contrôle inadéquates, les facteurs agro-environnementaux, la latence de la maladie et les mouvements d'animaux infectés (**Gilbert et al., 2005**). D'autres facteurs sont aussi évoqués tels que l'annulation des tests de dépistage à l'achat des bovins et la réduction des tests de contrôle dans les troupeaux (**Humblet et al., 2010**). Dans les pays industrialisés, les programmes de contrôle appuyés principalement sur l'interdiction du commerce des animaux infectés et de leurs produits dans et entre les pays ont considérablement réduit l'incidence de la maladie dans le bétail et chez l'homme (**Rossi et al., 2015**). Malgré les efforts déployés la tuberculose bovine est toujours une maladie (ré)émergente dans certains États membres de l'Union européenne et dans le monde entier (**Quadri et al., 2021**).

Dans les pays en voie de développement notamment ceux d'Afrique, la tuberculose animale reste largement distribuée (**Dibaba et Daborn, 2019 ; Ayad et al., 2020**), et les mesures de contrôle sont absentes ou appliquées de façon inadéquate ou occasionnelle (**Cosivi et al., 1998**).

En matière de diagnostic de laboratoire de la tuberculose bovine, celui-ci ne se résumait jusqu'alors qu'aux méthodes classiques. Les nouvelles méthodes de biologie moléculaire plus sensibles et plus spécifiques permettent de confirmer le diagnostic des mycobactéries d'origines animales. Ainsi, la caractérisation génomique des mycobactéries circulantes permet de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la maladie dans les espèces cibles, de la dynamique de l'infection ainsi que de l'adaptation dans les populations humaines et animales (**Narayanan, 2004**). En Algérie, peu d'études ont été publiées concernant les mycobactéries isolées à partir des bovins. Les premières études réalisées par **Sahraoui et al.** en **2009** et **2010** ont porté sur la caractérisation moléculaire des souches de *M. bovis* isolées en Algérie. Une seconde étude a été réalisée 10 ans après par **Damene et al. (2020)**. Ces travaux ont contribué fortement au moyen de techniques de plus en plus élaborées à l'identification du *M. bovis* circulant en Algérie ainsi qu'à l'élucidation du statut de la tuberculose bovine en Algérie.

Au regard de l'importance de cette maladie en Algérie, et du manque de données en la matière, nous nous sommes intéressées dans le présent travail de thèse à l'étude de l'agent causal de la tuberculose bovine. L'objectif principal est de caractériser génétiquement les populations algériennes de *M. bovis* par l'utilisation de deux méthodes de typage : le spoligotypage et la 19 loci MIRU-VNTR. Le but est d'améliorer et de compléter notre compréhension de l'épidémiologie de la tuberculose bovine en Algérie et d'essayer de dévoiler les voies de transmission de l'agent pathogène et retracer les sources d'infections.

Pour cela, nous avons réparti notre travail de thèse en deux sections principales :

- Une partie bibliographique constituée de deux chapitres, le premier est consacré aux généralités sur les mycobactéries et le second à la tuberculose bovine.
- Une partie expérimentale où sont développés, les objectifs, les matériels et méthodes utilisés, les résultats obtenus et leur discussion et enfin une conclusion et des perspectives.

Première partie : rappel bibliographique

PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Généralités sur les mycobactéries

La tuberculose est une maladie infectieuse due à *Mycobactérium bovis* principalement. C'est une maladie à déclaration obligatoire chez les bovins, selon la liste de l'OIE. *M. bovis* n'est pas spécifique aux bovins, il peut infecter de nombreux autres mammifères domestiques ou sauvages ainsi que l'homme. *M. bovis* est un germe intracellulaire qui se retrouve préférentiellement dans les organes riches en tissu réticulo-endothélial tel que les poumons, les nœuds lymphatiques et le foie.

I.1 Phylogénie

La taxonomie classe les mycobactéries dans le règne des procaryotes (*Bacteria*), à la classe des *Actinobacteria*, la sous-classe des *Actinobacteridae*, à l'ordre des *Actinomycetales*, le sous-ordre des *Corynebacterineae*, à la famille des *Mycobacteriaceae* et au genre *Mycobacterium* (Tableau 1).

Tableau 1 : Taxonomie des mycobactéries (Euzéby, 1997 ; Garrity et al., 2005)

Règne	Embranchement	Classe	Sous-classe	Ordre	Sous-ordre	Famille	Genre
Procaryotes	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Actinomycineae	Corynebacteriaceae	
					Micrococcineae		
					Corynebacterineae		
					Micromonosporineae	Dietziaceae	
					Propionibacterineae	Mycobacteriaceae → <i>Mycobacterium</i>	
					Pseudonocardineae	Nocardaceae	
					...	Seigniliaceae	
					Jiangellineae	Tsukamurellaceae	
						Nocardaceae	
				Bifidobacteriales			
Protistes							
Mycètes							
Plantes							
Animaux							

Le genre *Mycobacterium* comporte aujourd'hui plus de 190 espèces (**Tortoli, 2019**). Deux grands complexes de mycobactéries sont décrits, ils portent un intérêt aussi bien en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine :

➤ **Le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT)**

Dans ce genre on trouve des espèces pathogènes regroupées responsables de tuberculose chez l'homme ainsi qu'un grand nombre de mammifères (**Vasconcellos et al., 2010**). Les espèces du CMT et leurs hôtes correspondants sont : *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* (Homme et mammifères) (**Gutierrez et al., 2005**), *M. pinnipedii* (mammifères marins), *M. suricattae* (suricat) (**Viale et al., 2016**) et le bacille du chimpanzé (**Couvin et Rastogi, 2014**) ; ainsi que le *M. bovis* Bacille de Calmette et Guérin ou BCG (**Rodriguez-Campos et al., 2014**).

Trois autres membres du CMT ont été récemment décrits sur la base d'études génomiques, ils ont été isolés en majorité dans la région de l'Afrique australe : *M. mungi* (mangouste) (**Alexander et al., 2010**), le bacille de l'oryx (*M. orygis*) (**Dawson et al., 2012**), et le bacille de dassie chez l'hyraxe ou le rat des rochers (**Clarke et al., 2016**).

M. bovis et *M. caprae* sont les agents pathogènes les plus importants pour le bétail et la faune (**Domogalla et al., 2013**). En réalité, le bacille de la tuberculose possède l'un des plus larges spectres d'hôtes de tous les agents pathogènes connus (**O'Reilly et Daborn, 1995**). Le réservoir sauvage hôte de *M. bovis* comprend : le brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) en Nouvelle Zélande, le blaireau européen (*Meles meles*) en Grande Bretagne et en Irlande, le buffle d'Afrique (*Syncerus caffer*) en Afrique du Sud, le sanglier (*Sus scrofa*) dans la péninsule Ibérique et le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) au Michigan (USA) (**Palmer, 2013**).

➤ **Le complexe *Mycobacterium avium* (CMA)**

Les mycobactéries de ce complexe entraînent des infections opportunistes chez l'homme immunodéprimé, chez la volaille et d'autres espèces du bétail (**Viale et al., 2016**). Le CMA comprend les sous-espèces suivantes : *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. hominissuis*, *M. intracellulare*, *M. sylvaticum*, *M. colombiense*, *M. bouchodurhonense*, *M. timonense*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. yongonense*, et *Mycobacterium marseillense* (**Cayrou et al., 2010**).

I.2 Morphologie et structure des mycobactéries

Les mycobactéries possèdent une enveloppe proche de celle des bactéries Gram+, mais dont l'organisation, la richesse et la diversité des acides gras qui la composent sont uniques et caractéristiques.

- Les mycobactéries se présentent comme des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 1 à 10 μm de long et de 0,2 à 0,6 μm de large, aérobies strictes, immobiles, incapables de former des spores (**Magee et Ward, 2015**).
- Une des caractéristiques clés de la physiologie des espèces de mycobactéries est la présence d'une paroi cellulaire épaisse, avec une constitution biochimique exceptionnelle en phospholipides et en lipopolysaccharides (**Kieser et Rubin, 2014**). L'enveloppe cellulaire se compose de trois macromolécules distinctes formant plusieurs couches, le peptidoglycane, l'arabinogalactane et la couche la plus externe formée par les acides mycoliques. Agencées de la sorte, les couches forment une structure vitale pour la cellule dénommée le "complexe mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan" (**Jankute et al., 2015**).
- Parmi les lipides les plus importants, l'acide mycolique représente 30 à 40% de sa masse (**Brennan et Nikaido, 1995**). Les acides mycoliques sont très hydrophobes en raison de leur abondance et de la taille de leurs chaînes d'acides gras, dont la longueur est entre 60 et 100 atomes de carbones (**Lory, 2014**). Cette enveloppe particulière, très riche en lipides, confère à la bactérie ses propriétés tinctoriales, sa grande résistance aux stress chimiques, notamment aux antibiotiques et détergents et aux stress physiques (température).

I.3 Caractères généraux

Les principales propriétés des mycobactéries sont les suivantes :

- Ces bactéries ne se colorent jamais par les colorants usuels. Une caractéristique distinctive est leur capacité à conserver la coloration à la fuchsine après décoloration à l'alcool-acide, propriété tinctoriale essentielle appelée : l'acido-alcool-résistance, elle est liée à la forte teneur en lipides dans la paroi des mycobactéries (**Eisenstadt et Hall, 1995 ; Martin et Denis, 2011**). Ces bactéries sont appelées communément bacilles acido-alcool-résistants (BAAR).
- La croissance, parfois filamenteuse ou en forme de mycélium, donne généralement lieu à la formation d'éléments bacillaires ou coccoïdes (**Vincent, 1995**).
- Les mycobactéries peuvent survivre pendant des semaines, voire des mois, sur des objets inanimés si elles sont protégées du soleil. Ces bactéries peuvent résister plusieurs mois sur

des surfaces, dans le sol ou dans les bouses de vache à partir desquelles d'autres animaux peuvent être infectés (**Mitscherlich et Marth, 2012**).

- Les mycobactéries sont facilement détruites par la chaleur (>65°C pendant au moins 30 mn) et par la lumière UV (soleil), mais pas par la congélation ou la dessiccation. Elles sont plus résistantes aux acides, aux alcalins et à certains désinfectants chimiques que la plupart des autres bactéries non sporulées. Les composés d'ammonium quaternaire, l'hexachlorophène et la chlorhexidine sont au mieux bactériostatiques (**Pfyffer et Palicova, 2011**).
- *M. bovis* présente une résistance naturelle au pyrazinamide, mais il peut être sensible aux autres antibiotiques utilisés dans le traitement de la tuberculose humaine (**Forbes et al., 2018**). Cependant, une résistance à d'autres antibiotiques a également été détectée dans certains isolats de *M. bovis* chez l'homme, notamment la rifampicine et l'isoniazide. La résistance à ces deux médicaments essentiels dans le traitement de la tuberculose de première ligne chez l'homme conduit à l'apparition de la tuberculose multi résistante, qui constitue une menace majeure pour la santé humaine dans le monde (**WHO, 2017**).
- La morphologie des colonies varie selon les espèces, allant de lisse à rugueuse, et de non pigmentée à pigmentée. Les colonies peuvent être colorées en jaune, orange ou rarement en rose, généralement à cause de pigments caroténoïdes. Certaines espèces ont besoin de lumière pour former des pigments, tandis que d'autres forment des pigments à la lumière ou à l'obscurité (**Pfyffer et Palicova, 2011**).
- *M. bovis* se caractérise par une croissance lente (de 16 à 20 heures) (**Rodriguez-Morales et Castañeda-Hernández, 2014**).

I.4 Classification des mycobactéries

Il existe plusieurs classifications des mycobactéries ; en fonction de la vitesse de croissance, de la pigmentation et du pouvoir pathogène. Pour des raisons pratiques, les mycobactéries sont parfois différenciées en deux groupes :

- Celles du complexe tuberculosis ou mycobactéries tuberculeuses (CMT)
- Et les mycobactéries autres que le complexe *Mycobacterium tuberculosis*, ou non tuberculeuses (MNT) ou atypiques (**Rastogi, et al., 2001**).

Les bactéries du groupe MNT n'entraînent pas la tuberculose mais peuvent être responsables d'infections diverses chez l'homme notamment pulmonaires (**Porvaznik et al., 2016**). Le qualificatif d'atypique a été retenu sur des propriétés les différenciant des

mycobactéries responsables de la tuberculose et de la lèpre : des caractéristiques microbiologiques spécifiques, une résistance in vitro aux antituberculeux et un pouvoir pathogène différent (**Grosset et al., 1991**). Les mycobactéries atypiques sont des mycobactéries environnementales sans transmission interhumaine (**Metchock et Notte, 2001**).

De nombreuses espèces de MNT ont été décrites et très régulièrement de nouvelles espèces sont découvertes. En 1997, environ 50 espèces de MNT avaient été identifiées. En 2007, plus de 125 espèces avaient été décrites (**Griffith et al., 2007**). En 1959, **Runyon** a établi une classification des mycobactéries atypiques fondée sur la synthèse des pigments des colonies et la vitesse de croissance (**Tableau 2**). Quatre groupes ont été ainsi définis.

Tableau 2 : Classification des mycobactéries non tuberculeuses (**Adapté de Runyon 1959**).

Groupe	Classification		Description
I	Croissance lente >7 jours	Photochromogènes	Colonies non pigmentées mais deviennent jaune-orange après exposition à la lumière. Ex : <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i>
II		Schotochromogènes	Colonies pigmentées en présence comme en l'absence de lumière. Ex : <i>M. gordonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. aquae</i>
III		Non chromogènes	Colonies non pigmentées. Ex : <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. haemophilum</i>
IV	Croissance rapide <7 jours		Ex : <i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i>

Les groupes I, II et III sont des mycobactéries à croissance lente, nécessitant un temps similaire à celui requis pour *M. tuberculosis* pour se développer en culture, tandis que les organismes du groupe IV ont une croissance rapide (moins de 7 jours) (**Tableau 2**) (**Koh et al., 2002**). Les membres du CMT se développent lentement et sont non chromogènes (**Eisenstadt et Hall, 1995**).

Cependant, cette classification intéresse uniquement les MNT, une autre classification permet de différencier les mycobactéries selon leur écologie et leur pouvoir pathogène (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Classification de quelques espèces de mycobactéries selon leur écologie et leur pouvoir pathogène (**Rastogi, 2003 ; Kazda, 2009**)

Groupe	Habitat	Exemple
Saprophytes	Terre, environnement marin, rivières, mares, aquariums, étangs, eau courante, fumier, herbe de champs, peau, muqueuses d'individus sains.	<i>M. smegmatis</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M. terrae</i> (Portaels, 1995) Chez l'homme, responsables de maladie proche de la tuberculose mais d'évolution généralement plus bénigne (Pilet et al., 1979) .
Pathogènes opportuniste ou potentiels	Même environnement que les saprophytes. Elles sont plus fréquentes chez les patients immunodéprimés.	Chez l'homme : des infections pulmonaires (<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>) (Hoefsloot et al., 2013) , des infections cutanées (<i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i>) (Van Ingen, 2013) . Chez les animaux : <i>M. avium paratuberculosis</i> la paratuberculose chez les ruminants domestiques et sauvages et les primates. <i>M. avium</i> responsable de la tuberculose aviaire chez les oiseaux et les petits mammifères terrestres (Biet et al., 2005) . <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. scrofulaceum</i> (Martin et Maugein, 2012) .
Pathogènes strict ou obligatoire	Leur présence dans l'environnement est associée aux excréments des animaux infectés.	Responsable de tuberculose et de la lèpre chez l'homme et les mammifères. <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. leprae</i>

Ainsi les mycobactéries peuvent être différenciées en trois groupes :

- Des espèces saprophytes retrouvées naturellement dans l'environnement, ce sont des germes commensaux de l'homme et des animaux et des symbiotes dans l'écosystème **(Gcebe et Hlokwe, 2017)**. Ces espèces sont non pathogènes **(Martin et Maugein, 2012)**. La plupart des mycobactéries saprophytes sont des espèces rares qui poussent rapidement, temps de division moyen ≤ 2 h à 6 h, **(Rastogi et al., 2001)**.
- Des espèces potentiellement pathogènes, elles sont présentes dans l'environnement. Elles peuvent devenir pathogènes pour l'homme et l'animal dans certaines circonstances. Elles ont une croissance lente (temps de division moyen de 12 h à 24 h) **(Rastogi, et al., 2001)**.
- Les mycobactéries tuberculeuses sont des pathogènes obligatoires responsables de tuberculose et de la lèpre, et ont une croissance lente. Contrairement aux autres types de mycobactéries, leur présence dans l'environnement n'a pas été démontrée. Le CMT comprend à ce jour 13 espèces, qui malgré une forte identité génétique, présentent des phénotypes, des hôtes et des pouvoirs pathogènes variés.

Selon la littérature scientifique, nous retrouvons également une autre classification, celle-ci se base sur la combinaison de 3 types de critères incluant l'épidémiologie, la capacité de cultiver in vitro **(Forbes et al., 2018)** ainsi que la symptomatologie **(Wallace et al., 1997; Campbell et al., 2000)**. Basée sur ces 3 critères, 4 groupes de mycobactéries sont distinguées :

- Les mycobactéries du complexe tuberculosis (CMT)
- *M. leprae* (lèpre humaine)
- *M. ulcerans* (ulcère de Buruli chez l'homme)
- Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT)

Toutefois, grâce aux progrès rapides de la technologie de séquençage entier du génome des arbres phylogénétiques plus robustes ont été construits offrant une meilleure résolution dans l'identification des relations à divers niveaux taxonomiques **(Adeolu et al., 2016)**.

Un certain nombre d'études récentes ont fait état d'analyses phylogénétiques basées sur de grands ensembles de données de gènes/protéines de base provenant des génomes de 28 à 47 espèces de mycobacterium afin d'élucider leurs relations **(Fedrizzi et al., 2017)**. Sur la base des séquences génomiques, la parenté génomique entre les organismes peut également être déterminée et cette approche est maintenant largement appliquée dans les études taxonomiques **(Qin et al., 2014)**.

Ainsi, les séquences génomiques de 150 membres du genre mycobacterium sont accessibles au public dans la base de données génomiques du NCBI (**Gupta et al., 2018**).

I.5 Description génomique

La souche de *M. tuberculosis* H37Rv est une souche de laboratoire dont le génome a été le premier à être complètement séquencé. Elle est utilisée comme souche de référence dans la recherche en génomique comparative (**Li et al., 2015**). En 1998, **Cole** et collaborateurs ont réalisé le séquençage du génome entier de *M. tuberculosis*. L'ADN consiste en un chromosome circulaire de 4.411.529 paires de bases (pb) contenant environ 4000 gènes. Egalement, le séquençage du génome de *M. bovis* AF2122_97 isolé en 1997 en Grande Bretagne, montre que le génome a une longueur de 4 345 492 pb (**Tableau 4**), disposées en un seul chromosome circulaire avec 3952 gènes qui codent pour différentes protéines (**Figure 1**) (**Garnier et al., 2003**).

Tableau 4 : Tailles génomiques et nombre de gènes de quelques espèces de mycobactéries entièrement séquencés.

Espèce	Référence	Taille du génome (pb)	Nombre de gènes
<i>M. abscessus</i>	(Ripoll et al. 2009)	5067172	4920
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	(Li et al. 2005)	4829781	4350
<i>M. bovis</i>	(Garnier et al. 2003)	4345492	3953
<i>M. gilvum</i>	(Ripoll et al. 2009)	5619607	5241
<i>M. leprae</i>	(Stinear et al. 2010)	3268203	1605
<i>M. marinum</i>	(Stinear et al. 2010)	6636827	5424
<i>M. smegmatis</i>	(Li et al. 2005)	6988209	6897
<i>M. tuberculosis</i>	(Cole et al. 1998)	4411532	3959
<i>M. ulcerans</i>	(Stinear et al. 2010)	5631606	4160
<i>M. vanbaalenii</i>	(Ripoll et al. 2009)	6491865	5979

Les mycobactéries environnementales possèdent les génomes les plus importants (*M. avium*, *M. smegmatis*) (**Tableau 4**). *M. leprae* possède le génome le plus petit des mycobactéries avec 3,3 millions paires de bases codant pour 1 614 gènes (**Cole et al., 2001**). Les mycobactéries tuberculeuses *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. bovis* ont un génome de taille intermédiaire. Les génomes des mycobactéries présentent des capacités codantes importantes, de l'ordre de 90% pour *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. smegmatis* (**Garnier et al., 2003**; **Cole et al., 1998**; **Li et al., 2005**).

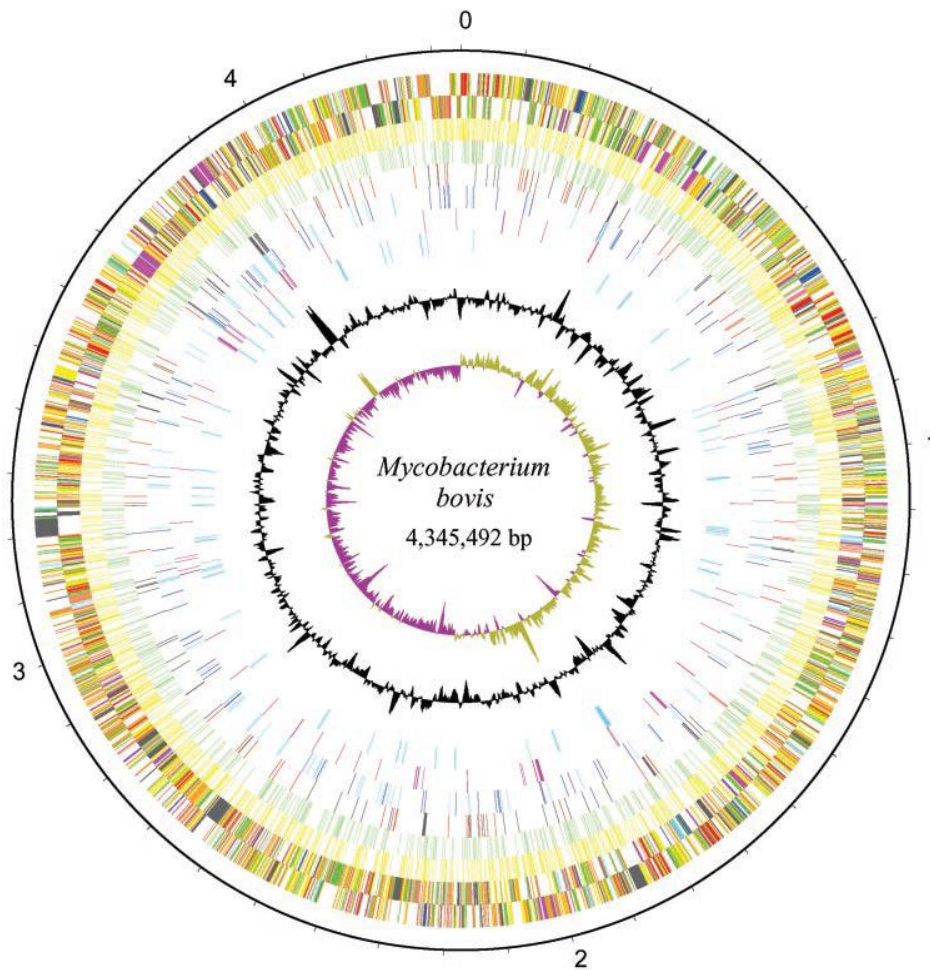


Figure 1 : Représentation schématique du génome de *M. bovis* (**Garnier et al., 2003**)

I.6 Caractéristiques génétiques

L'ADN mycobactérien se caractérise par un fort pourcentage en guanine (G) et en cytosine (C), compris entre 61 et 71% (**Vincent, 1995**). Les espèces du CMT ont une structure de population fortement clonale (**Pepperell et al., 2013**) contrairement à la plupart des autres bactéries pathogènes. Leurs génomes présentent une similarité supérieure à 99,9% au niveau nucléotidique et de certaines séquences d'ARNr 16S (**Böddinghaus et al., 1990**). Malgré cette forte similarité, les espèces du CMT se différencient par des régions polymorphiques liées à des délétions et à des réarrangements de séquences (**Brosch et al., 2002**). Cette variabilité génomique permet à la fois de différencier les espèces entre elles et de retracer leur évolution phylogénétique.

CHAPITRE II : La tuberculose bovine

II. Épidémiologie

II.1.1 Distribution géographique

La tuberculose a été signalée dans tous les continents où des bovins sont retrouvés **(Smith, 2012)**. La maladie est largement répandue dans la majeure partie de l'Afrique, dans certaines régions d'Asie et du continent Américain ainsi que dans les pays du Moyen-Orient **(Amanfu, 2006)**.

Durant la période 2015-2017, selon le système mondial d'information zoosanitaire de l'OIE (WAHIS), 91 pays sur 182 ont signalé la présence d'une infection à la tuberculose chez les bovins. En Afrique, 30 pays sur 59 ont signalé la présence de la maladie au cours de la même période. De janvier 2017 à juin 2018, parmi les 188 pays et territoires membre de l'OIE, 82 (44%) étaient infectés, ce qui montre une répartition étendue de la maladie **(Figure 2)**. Parmi les 82 pays touchés, 29 (35,4%) ont signalé la présence de tuberculose chez le bétail et la faune sauvage. Deux pays (2,4%) ont signalé une présence de la maladie chez les espèces sauvages uniquement, contre 51 (62,2%) qui ont indiqué sa présence chez le bétail uniquement **(Murai *al.*, 2019)**.

Cependant, la tuberculose a été éliminée ou son incidence a été réduite chez les animaux de ferme grâce aux programmes de contrôle dans de nombreux pays industrialisés **(EFSA, 2012)**. Selon l'OIE-WAHIS, les pays classés indemnes de tuberculose sont : l'Australie, l'Islande, le Danemark, la Suède, la Norvège, la Finlande, l'Autriche, la Suisse, le Luxembourg, la Lettonie, la Slovaquie, la Lituanie, l'Estonie, la République tchèque, le Canada, Singapour, la Jamaïque, la Barbade et Israël. Bien que la majorité des pays de l'Europe aient éradiqué la tuberculose, quelques troupeaux infectés continuent d'être signalés, ces pays sont donc toujours confrontés au défi permanent de la réintroduction de la maladie dans les troupeaux de bovins. Parmi les pays les plus touchés on retrouve l'Irlande et la Nouvelle Zélande **(Allen *et al.*, 2018)**.

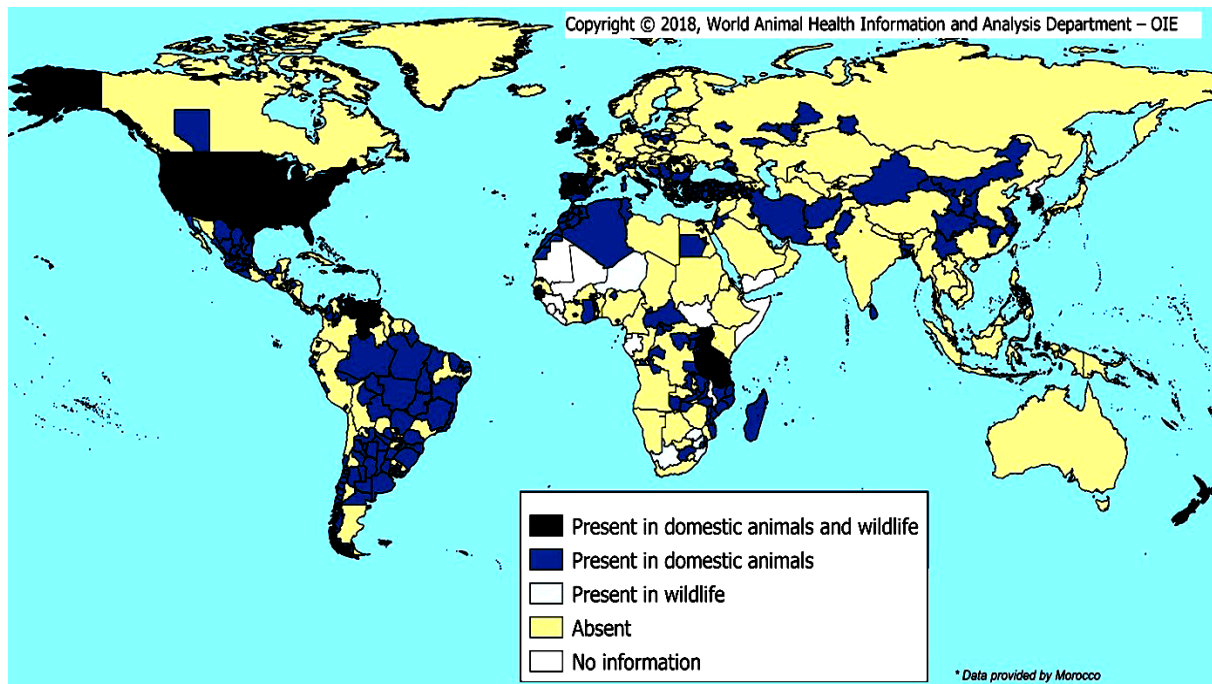


Figure 2 : Distribution globale de la tuberculose en 2017 et durant le premier semestre 2018 (Murai *et al.*, 2019).

II.1.2 Facteurs de risques

Les facteurs de risque englobent plusieurs paramètres en relation avec le contact entre le bétail, les mouvements et la densité des animaux ainsi que la faune sauvage (**Figure 3**) :

- De nombreux éléments démontrent de manière convaincante que la constitution génétique de l'hôte joue un rôle important dans l'issue de l'infection par la tuberculose chez l'homme comme chez l'animal (**Le Roex et al.**, 2013).
- L'introduction récente de nouveaux animaux provenant du marché à bestiaux a été identifiée comme un facteur de risque important (**Oloya et al.**, 2007).
- De nombreuses études ont montré que les races du bétail peuvent afficher différents niveaux de sensibilité à la tuberculose (**Le Roex et al.**, 2013). Une étude réalisée par **Ameni et al.** (2007) en Ethiopie sur des bovins zébus, des croisements de bovins Zébu-Holstein et des bovins Holstein dans des conditions d'élevage identiques a montré à la fois une prévalence et une sévérité plus élevées de la tuberculose chez les bovins Holstein par rapport aux Zebu ou Zebu-Holstein. Une autre étude portant sur des bovins d'Ethiopie (**Biffa et al.**, 2012) identifie la race comme étant un facteur important affectant la manifestation de la tuberculose. Parmi les races, locales, exotiques ou croisées, les bovins exotiques présentaient un risque plus élevé de pathologie grave de tuberculose.

- ↗ Les mouvements du troupeau ont été identifiés comme un facteur de risque augmentant la transmission de la tuberculose (**Dejene et al., 2016**). Certaines, stratégies d'élevage reposent sur le déplacement du bétail à la recherche de pâturages et de ressources en eau sur des distances considérables suite aux changements saisonniers, ce qui peut être favorable à la transmission et à la propagation de la maladie.
- ↗ L'agriculture intensive occupe une place importante comme facteur de risque dans la transmission de la tuberculose (**Humblet et al., 2010**). Dans les exploitations laitières ayant une forte densité de bovins ou dans des systèmes de production hébergeant des animaux ensemble pendant de longues périodes, le taux de transmission entre animaux sensibles peut être très élevé (**Cousins, 2001**). En Afrique de l'Est, les éleveurs élèvent de nombreuses espèces, principalement des bovins, des ovins, des caprins, des chameaux et des ânes, souvent en grands troupeaux (**Dejene et al., 2016**) ce qui augmente le risque de contamination.

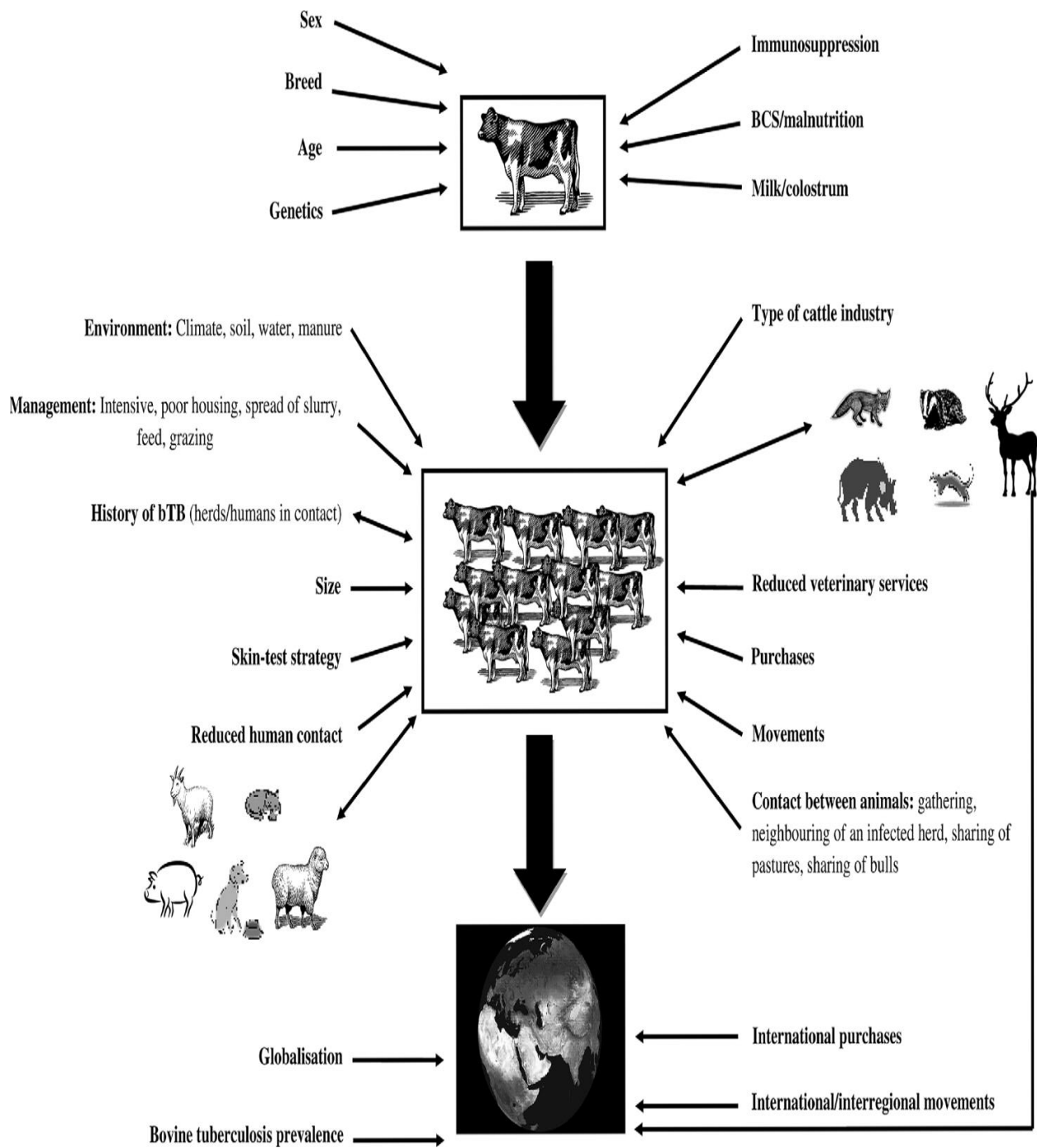


Figure 3 : Principaux facteurs de risque de transmission de la tuberculose
(Humblet et al., 2009)

II.1.3 Sources d'infection et mode de transmission

Le mode de transmission chez les bovins est principalement horizontal.

- Le principal mode de propagation de la tuberculose entre troupeaux est l'introduction d'animaux infectés dans un troupeau non infecté (**Cousins, 2001**). La tuberculose chez les animaux et l'homme est principalement une maladie respiratoire (**O'Reilly et Daborn, 1995**). L'inhalation est probablement la principale voie d'infection chez les bovins, elle est facilitée par un contact étroit et prolongé avec des animaux infectés (**Ayele et al., 2004**). L'infection se transmet aux bovins par des sécrétions respiratoires (**Brotherstone et al., 2010**) principalement par inhalation d'aérosols infectieux (**Smith et al., 2004**) provenant d'un animal qui tousse ou éternue et qui présente une forme ouverte de tuberculose (**Cousins, 2001**).
- Les veaux nourris au lait peuvent être infectés par ingestion de lait contaminé provenant de vaches tuberculeuses (**Evangelista et De Anda, 1996**).
- D'autre part, l'ingestion de *M. bovis* directement des pâturages, de l'eau ou des ustensiles contaminés peut également être très courante (**Ayele et al., 2004**).
- L'urine, les sécrétions vaginales, le sperme ou les selles provenant d'individus infectés peuvent contenir des bacilles tuberculeux et constituer un moyen de transmission de la maladie entre les animaux (**Cousins, 2001**). D'autres modes de transmissions sont décrits dans la littérature telle que la transmission congénitale via le cordon ombilicale et l'infection génitale durant le coït (**Menzies et Neill, 2000**).

II.1.4 Pathogénèse

Le bacille est introduit dans l'organisme le plus souvent par le système respiratoire ou le système digestif. Globalement, l'infection commence lorsque les bacilles pénètrent dans les macrophages par phagocytose, où ils sont englobés dans un phagosome et protégés des défenses immunitaires. La fusion d'un lysosome avec un phagosome (phagolysosome) crée la destruction intracellulaire des bacilles par acidification. En revanche, certaines mycobactéries inhibent cette fusion, empêchant ainsi l'acidification et la destruction des bacilles. Une réponse immunologique à l'infection est initiée par le biais d'une interaction de nombreux types de cellules conduisant au développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (CMI) essentielle pour l'immunité protectrice. Une fois qu'une réponse CMI est initiée, un granulome se forme autour des macrophages infectés suite aux interactions entre les cellules immunitaires et les cytokines : le granulome est une réponse protectrice

permettant de localiser l'infection et d'empêcher une dissémination ultérieure (**Robinson et al., 2012**).

Le devenir de l'infection tuberculeuse passe par plusieurs étapes :

- La période de primo infection : elle correspond au premier contact de l'organisme avec le bacille. Cette primo infection se caractérise par l'apparition du « complexe primaire » qui comprend une lésion initiale, le chancre d'inoculation localisé selon la voie de pénétration, associé à une adénopathie du ganglion correspondant. Le complexe primaire peut évoluer vers la guérison, la stabilisation ou la généralisation précoce. Dans certains cas défavorables, les bacilles passent par la voie lympho-hématogène ce qui donne une tuberculose de généralisation précoce, qui se traduit par une tuberculose miliaire aiguë ou bien une tuberculose de généralisation progressive d'évolution lente (**Flachat et Favre, 1975**).
- La période de surinfection : elle découle du contact répété de l'organisme avec des bacilles provenant des lésions de primo-infection ou du milieu exogène. Elle peut donner lieu à une tuberculose chronique d'organe, si les défenses de l'organisme sont efficaces. Dans le cas contraire, la surinfection se propage traduisant une tuberculose de généralisation tardive à savoir la tuberculose miliaire aiguë ou bien la tuberculose caséeuse de surinfection. Ces deux formes peuvent se stabiliser ou évoluer (**Thorel, 2003**).

II.2 Diagnostic de la tuberculose bovine

Les données sur la tuberculose sont principalement basées sur les rapports d'abattoirs établis par les inspecteurs vétérinaires sur la base des examens ante mortem et post-mortem, ainsi que ceux établis après utilisation de tests à la tuberculine sur terrain. Cependant, ces techniques ne permettent pas de distinguer les membres du CMT (**Koro Koro et al., 2015**). Pour cela, des tests diagnostic sont utilisés depuis longtemps basés essentiellement sur la culture du *M. bovis*, ainsi que la mise en évidence des réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale de l'agent causal, d'autres tests ont été développés par la suite et concerne la détection d'ADN des mycobactéries.

II.2.1 Diagnostic ante mortem

a. Manifestations cliniques

Les symptômes de la tuberculose prennent habituellement plusieurs mois pour se développer chez les bovins. L'infection peut rester en état de dormance pendant des années et

se réactiver lors de stress ou chez les sujets âgés (**Ramos et al., 2015**). Certains animaux passent une partie importante de leur vie sans aucune symptomatologie décelable.

L'infection est souvent subclinique, lorsqu'ils sont présents, les signes ne sont pas spécifiquement distinctifs et peuvent inclure une faiblesse, une anorexie, une émaciation, une hypertrophie des ganglions lymphatiques (**Belachew, 2017**). Dans sa forme classique, les animaux malades présentent une cachexie, prostration et une baisse de la production laitière (**Dametto et al., 2020**). A un état plus avancé, l'atteinte pulmonaire se caractérise par une dyspnée, une toux chronique humide, plus marquée le matin et par temps froid, et une tolérance réduite à l'exercice (**OIE, 2018**). Dans la forme digestive, on peut observer de la diarrhée ou de la constipation (**Kuria, 2019**). D'autres formes de tuberculose sont décrites, telles que la métrite tuberculeuse qui peut s'accompagner de pertes vaginales purulentes chroniques, à l'origine d'avortement et de stérilité (**Kuria, 2019**). La mammite tuberculeuse provoque le durcissement des quartiers mammaires et l'agrandissement des ganglions lymphatiques supramammaires. Dans les cas chroniques, le lait peut présenter de fins grumeaux à la fin de la traite et la couleur peut virer à l'ambre (**Paes, 2010**).

b. Dépistage par tuberculation

Les stratégies de contrôle de la tuberculose reposent traditionnellement sur l'utilisation de tuberculines (dérivés de protéines purifiées) produites à partir de *M. bovis* et *M. avium* (PPD-B et PPD-A, respectivement) (**Pollock et al., 2005**). Le test cutané permet une mesure de la réaction CMI médiée par des lymphocytes T dépendant de l'hypersensibilité de type retardée en réponse à la tuberculine (**Pollock et al., 2006**). Dans son format le plus simple, le test cutané est effectué par injection d'un petit volume de tuberculine bovine dans la peau. Environ 72 heures après, le site d'injection est palpé et examiné pour la recherche de tout signe inflammatoire (**Buddle et al., 2015**). Une augmentation de l'épaisseur de la peau de quelques millimètres à 20 mm ou plus est enregistrée chez les bovins positifs au test (**Pollock et al., 2003**). Le test intradermique simple peut être appliqué sur la peau de la région mi-cervicale ou à la base de la queue (pli caudal) (**Monaghan et al., 1994**). Ce test s'est révélé simple, peu coûteux, robuste et largement accepté (**Parlane et al., 2015**).

Cependant, le test cutané peut présenter des inconvénients notamment à cause des réactions faussement négatives (**Buddle et al., 2009**). L'anergie peut être engendrée par plusieurs facteurs : une infection très récente à *M. bovis*, un stress lié à une malnutrition, au transport, à la parturition, une infection virale concomitante, l'utilisation de médicaments

immunosuppresseurs, variation dans l'application du test ou une interprétation incohérente de la part du manipulateur.

D'autre part les réactions faussement positives du test cutané peuvent être liées à l'exposition des animaux aux mycobactéries de l'environnement, en raison de la présence d'antigènes communs entre les différentes souches de mycobactéries (**Pollock et al., 2005**). Malgré ces inconvénients, l'Organisation Mondiale de la Santé Animale, considère le test cutané à la tuberculine la référence pour la détection de la tuberculose in vivo.

c. Dosage de l'interféron gamma (IFN- γ)

L'analyse par l'IFN- γ a été mise au point en 1985 (**Wood et al., 1990**). Ce test repose sur la détection de l'IFN- γ produit par les lymphocytes présents dans des échantillons de sang stimulés par des antigènes spécifiques (PPD bovines et aviaires). Après 24 heures, les échantillons de sang sont centrifugés et le plasma résultant est analysé à l'aide d'un test ELISA en sandwich (**Wood et al., 1990**). En comparaison avec le test cutané, ce test montre une meilleure sensibilité mais une spécificité égale ou inférieure (**Puckett et al., 2017**). L'IFN- γ est utilisé comme test de diagnostic auxiliaire au test cutané dans le but de détecter un nombre maximum d'animaux infectés. Cela permet de détecter d'autres animaux infectés qui seraient autrement considérés comme négatifs avec le test cutané utilisé seul (**Clegg et al., 2019**). Le test Bovigam est un exemple de test sanguin de dosage de l'IFN- γ commercialisé pour le diagnostic rapide de la tuberculose chez les bovins, ovins, caprins et autres bovidés tels que le buffle (**Wood et Jones, 2001**).

d. Sérodiagnostic

Les tests sérologiques sont basés sur la réponse immunitaire à médiation humorale, c'est-à-dire la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes mycobactériens (**Souza et al., 2012**). Un des tests sérologiques utilisés est le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) (**Waters et al., 2017**). En général, ces essais sont simples, rapides et non coûteux, mais montrent une sensibilité insuffisante (**Wedlock et al., 2002**). De plus, leur spécificité peut être affectée par la présence d'autres infections à mycobactéries, telles que la paratuberculose (**Pollock et al., 2005**). En outre, l'identification chez les mycobactéries de nouveaux antigènes de diagnostic plus spécifiques tels que le MPB70, MPB83, ESAT6, CFP10 et l'introduction de stratégies de dosage multiplex telle que la méthode MAPIA (Multi-Antigen Print ImmunoAssay), ces nouvelles approches ont permis un meilleur diagnostic sérologique de la tuberculose chez les bovins et chez les espèces sauvages (**Fontana et al., 2018**).

II.2.2 Diagnostic post mortem

La surveillance de la tuberculose aux abattoirs joue un rôle important dans la détection des élevages infectés, notamment pour les animaux ayant réagi négativement au test de tuberculination. Le diagnostic post mortem de tuberculose se fait en deux temps ; l'observation des lésions tuberculeuses aux abattoirs et la confirmation de ces lésions au laboratoire par microscopie et isolement de l'agent pathogène sur milieux spécifiques ainsi que l'identification biochimique.

A. Diagnostic lésionnel à l'abattoir

La tuberculose est une maladie chronique et progressive, caractérisée par la formation de lésions granulomateuses typiques avec divers degrés de nécrose, de calcification et d'encapsulation (**Michel et al., 2010**). Cette lésion macroscopique typique de la tuberculose appelé tubercule, est un nodule inflammatoire granulomateux jaunâtre circonscrit d'environ 2–20 mm de diamètre, plus ou moins encapsulé dans du tissu conjonctif et contenant souvent une nécrose caséuse centrale (**Domingo et al., 2014**). Les lésions tuberculeuses caractéristiques surviennent le plus souvent dans les poumons et les ganglions lymphatiques bronchiques, médiastinaux et rétropharyngés. Des lésions sont également décrites dans les ganglions lymphatiques mésentériques (**Michel et al., 2010**), le foie, la rate et la surface de la cavité abdominale (**Verna et al., 2014**).

Du centre à la périphérie, le nodule est constitué d'une masse nécrosée, de dépôts de calcium, de bacilles, de lymphocytes, de cellules épithélioïdes et de tissu conjonctif fibreux (**Rani et al., 2017**). Grâce à des coupes histologiques, la composition cellulaire et la morphologie des granulomes est décrite, ces derniers sont classés en quatre stades : stade I (initial), stade II (solide), stade III (nécrotique) et stade IV (nécrotique et minéralisé) (**Dana et al., 2018**).

Lorsque l'organisme est incapable de surmonter l'infection, la maladie passe à la chronicité, par conséquent, la lésion granulomateuse petite au point d'entrée devient plus large avec le temps. Dans les poumons, la lésion chronique se caractérise par une extension à travers l'arbre bronchiolaire et bronchique avec une nécrose caséuse multifocale confluyente et éventuellement la formation de lésions caverneuses. Des lésions ulcéreuses dans les bronches et la trachée peuvent survenir (**Domingo et al., 2014**). De même, les ganglions lymphatiques affectés peuvent devenir considérablement élargis et entièrement occupés par la matière granulomateuse caséuse entourées de trabécules de tissu fibreux irréguliers (**Domingo et al., 2014**). Les lésions exsudatives subissent plus au moins rapidement une

organisation folliculaire qui donne naissance au tubercule miliaire (gris-jaune cru) (**Flachat et Favre, 1975**). Lorsque les bactéries s'échappent du point d'origine, elles peuvent se propager à d'autres parties de l'organisme via les voies lymphatiques ou le sang, il se produit alors une dissémination générale et la formation de multiples lésions (**Dana et al., 2018**).

B. Diagnostic de laboratoire

1. Examen bactérioscopique

Les mycobactéries peuvent être mises en évidence au microscope sur des frottis à partir d'échantillons cliniques ou dans des broyats d'organes tuberculeux. La révélation des mycobactéries peut être déterminée par la coloration de Ziehl-Neelsen au microscope optique ou par la coloration à l'auramine au microscope à fluorescence (**Marais et al., 2008**). Ces techniques sont basées sur les propriétés tinctoriales communes aux bacilles acido-alcool-résistants. Les mycobactéries peuvent retenir la matière chauffée à la fuchsine après un traitement alcool-acide (**Ramosa et al., 2015**). La coloration de Ziehl-Neelsen, constitue la méthode « Gold standard », pour le diagnostic de la maladie (**OIE, 2018**), les bacilles apparaissant sous forme de bâtonnets rouges sur fond bleu (**Sharma et al., 2005**).

La coloration à l'auramine est basée sur l'utilisation d'un colorant fluorochrome tel que l'auramine O ou l'auramine-rhodamine, la révélation des bacilles nécessite un microscope à fluorescence (**Steingart et al., 2006**). Dans cette méthode, les bacilles apparaissent jaunes fluorescents sur fond rouge (**Thorel, 2003**).

Toutefois, la détection microscopique des mycobactéries montre une sensibilité généralement faible (de 50 à 70%) pour les échantillons de crachats humains (**Ramosa et al., 2015**). Ces méthodes de coloration ne permettent pas de discriminer les espèces de mycobactéries et ne sont pas spécifiques du genre *Mycobacterium*, puisqu'elles peuvent colorer d'autres actinobactéries (**Shinnick et Good, 1994**).

2. Culture et identification biochimique

La confirmation des cas de tuberculose suspectée en post-mortem ne peut se faire que par la mise en évidence de l'agent causal au laboratoire. La culture reste la méthode « gold standard » pour le diagnostic d'infection à *M. bovis* (**Cousins et Florisson, 2005**). La technique de culture de *M. bovis* est décrite dans le manuel terrestre de l'OIE (**2018**). L'échantillon est broyé, puis décontaminé par le chlorure d'hexadécylpyridinium (HPC) ou l'hydroxide de sodium (NaOH, 2-4%).

Le mélange est ensuite agité pendant 10–15 mn à température ambiante, puis la suspension est centrifugée, le sédiment est utilisé comme inoculum pour la culture. Plusieurs milieux de cultures sont utilisés pour l'isolement des mycobactéries, le milieu solide à l'œuf de Lowenstein–Jensen, le milieu Coletsos ou Stonebrinks, d'autres milieux de cultures sont utilisés tels que le milieu Middlebrook et le milieu gélosé au sang (**Cousins et al., 1989**).

Les cultures sont incubées pendant au moins 8 semaines (préférentiellement de 10 à 12 semaines) à 37°C. La croissance de *M. bovis* se produit généralement dans les 3 à 6 semaines d'incubation (**OIE, 2018**). Des durées d'incubation allant jusqu'à trois mois ont été mentionnées dans la littérature (**Courcoul et al., 2014**).

L'identification des mycobactéries obtenues après isolement repose classiquement sur l'étude des caractères cultureux (temps de croissance, morphologie et pigmentation des colonies) et biochimiques (**Tableau 5**). Les épreuves biochimiques simples permettent de faire la distinction entre les bacilles du CMT et ceux du MNT notamment par la recherche de l'activité catalasique et le test de la niacine (**Grosset et al., 1990**).

L'espèce *M. tuberculosis* cultive en 21 à 28 jours sur milieu de Löwenstein-Jensen et donne de grosses colonies en « chou-fleur », de teinte crème-beige, à surface sèche et rugueuse. Naturellement sensible à l'isoniazide, elle a une activité catalasique thermolabile (20 mn à 68°C) et une activité nitrate réductase (**Grosset et al., 1990**). Elle est naturellement résistante à l'hydrazide de l'acide thiophène carboxylique (TCH) et naturellement sensible à l'acide para-aminosalicylique (PAS) (**Grosset et al., 1990**). Les colonies de *M. bovis* sont typiques, elles sont petites, non pigmentées, lisses et dysgoniques, d'abord plates elles deviennent ensuite bombées, brillantes mais ne dépassent pas la taille d'une tête d'épingle. *M. bovis* se développe mieux sur milieux sans glycérine et sur milieu enrichi en pyruvate (**Thorel, 2003**). *M. bovis* est sensible au TCH et au PAS, ne possède pas de nitrate réductase et n'accumule pas de niacine (**OIE, 2018**).

Tableau 5 : Caractères d'identification biochimique des principales mycobactéries (Pilet et *al.*, 1979).

Espèce	Vitesse de croissance (jours)	Niacine	Nitrate réductase	Catalase		Uréase	Hydrolyse tween 80		Lauryl-sulfatase		TCH
				22°C	68°C		5jour	10jour	3jour	2semaine	
<i>M.tuberculosis</i>	12-30	+	+	+	-	+	?-	±	-	-	+
<i>M.bovis</i>	25-90	-	-	+	-	+	±	-	-	-	-
<i>M.africanum</i>	1490	±	±	+	-	±		±	-	-	+
<i>M.marinum</i>	7-1	±	-	+	-	+	+	+	±	+	-
<i>M.kansasii</i>	10-21	-	+	+	+	-	+	+	-	±	-
<i>M.scrofulaceum</i>	10-30	-	±	+	+	+	-	-	-	-	±
<i>M.gordonae</i>	10-25	-	-	+	+	-	+	+	-	±	-
<i>M.flavescens</i>	10-14	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>M.szulgai</i>	10-25	-	+	+	+	+	-	+	±	+	+
<i>M.avium</i>	10-21	-	-	+	+	-	-	-	-	±	-
<i>M.intracellulare</i>	10-21	-	-	+	+	-	-	-	-	±	-
<i>M.gastri</i>	10-21	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>M.terrae</i>	10-21	-	+	+	+	-	+	+	±	+	±
<i>M.xenopi</i>	10-35	-	-	+	+	-	-	-	±	+	-
<i>M.fortuitum</i>	3-5	-	+	+	+	±	±	±	±	+	+
<i>M.chelonai</i>	3-5	±	-	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>M.ulcerans</i>	90-120	±	-	+	+	?	?	?	?	?	?

3. Identification et caractérisation moléculaire

Après culture, la détection et l'identification moléculaire des isolats doit être réalisée afin d'affiner la caractérisation des souches. Le typage moléculaire de *M. bovis* s'avère très utile dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. Il permet de distinguer entre des isolats de *M. bovis* d'origines différentes et ainsi de préciser les sources probables d'infection (**Durand et al., 2004**). Plusieurs techniques d'identification et de typage sont utilisées.

a. Etude des régions de différences (RD)

Il existe dans le génome du complexe *mycobacterium tuberculosis* une série de délétions appelées régions de différence (RD) (**Brosch et al., 2002**). L'étude de l'apparition successive des RD au cours de l'évolution a permis d'identifier les relations phylogénétiques entre les membres de ce complexe et d'établir précisément la phylogénie des différentes espèces (**Figure 4**) (**Dippenaar et al., 2015**). Les analyses comparatives des génomes ont permis d'identifier au moins 20 RD dans le génome du CMT, qui résultent d'événements d'insertion-délétion (**Ru et al., 2017**). L'étude des RD a permis de retracer la phylogénie des bactéries du CMT à partir de leur ancêtre commun (**Brosch et al., 2002**). Le scénario de l'évolution des bactéries du CMT est schématisé dans la **Figure 4**. Selon la littérature, l'ancêtre du CMT appelé *M. protuberculosis* constituerait la progéniture du *M. tuberculosis*.

Selon la figure 4, deux clades principaux peuvent être observés. Un clade de souches spécifiques de l'homme, caractérisé par la délétion TbD1, qui a donné les différentes lignées modernes de *M. tuberculosis*. Un second clade caractérisé par la perte des régions RD7, RD8, RD9 et RD10 regroupe des souches endémiques d'Afrique spécifiques de l'homme (*M. africanum*), d'animaux (le bacille du Chimpanzee, *M. mungi*, le bacille de Dassie et *M. suricattae*), ainsi que des souches adaptées à différentes espèces de mammifères (*M. orygis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* et *M. bovis*).

Des régions de différence (RD1-RD14), codant pour environ 140 protéines, ont été trouvées absentes chez *M. bovis* BCG, par rapport à la souche *M. tuberculosis* H37Rv (**Brosch et al., 2004**). L'absence de RD4 est spécifique à *M. bovis* et *M. bovis* BCG et permet de les différencier des autres membres du CMT (**Huard et al., 2006**). La région RD1 est présente chez *M. tuberculosis* et *M. bovis*, quatre régions (RD3, RD14 à RD16) sont absentes dans certaines souches BCG. Neuf autres régions (RD4 à RD10, RD12 et RD13) sont présentes chez *M. tuberculosis* mais absentes chez *M. bovis* et *M. bovis* BCG. Seules les régions RD1 et RD3 sont absentes de toutes les souches BCG et présentes chez *M. bovis* (**Brosch et al., 2000**).

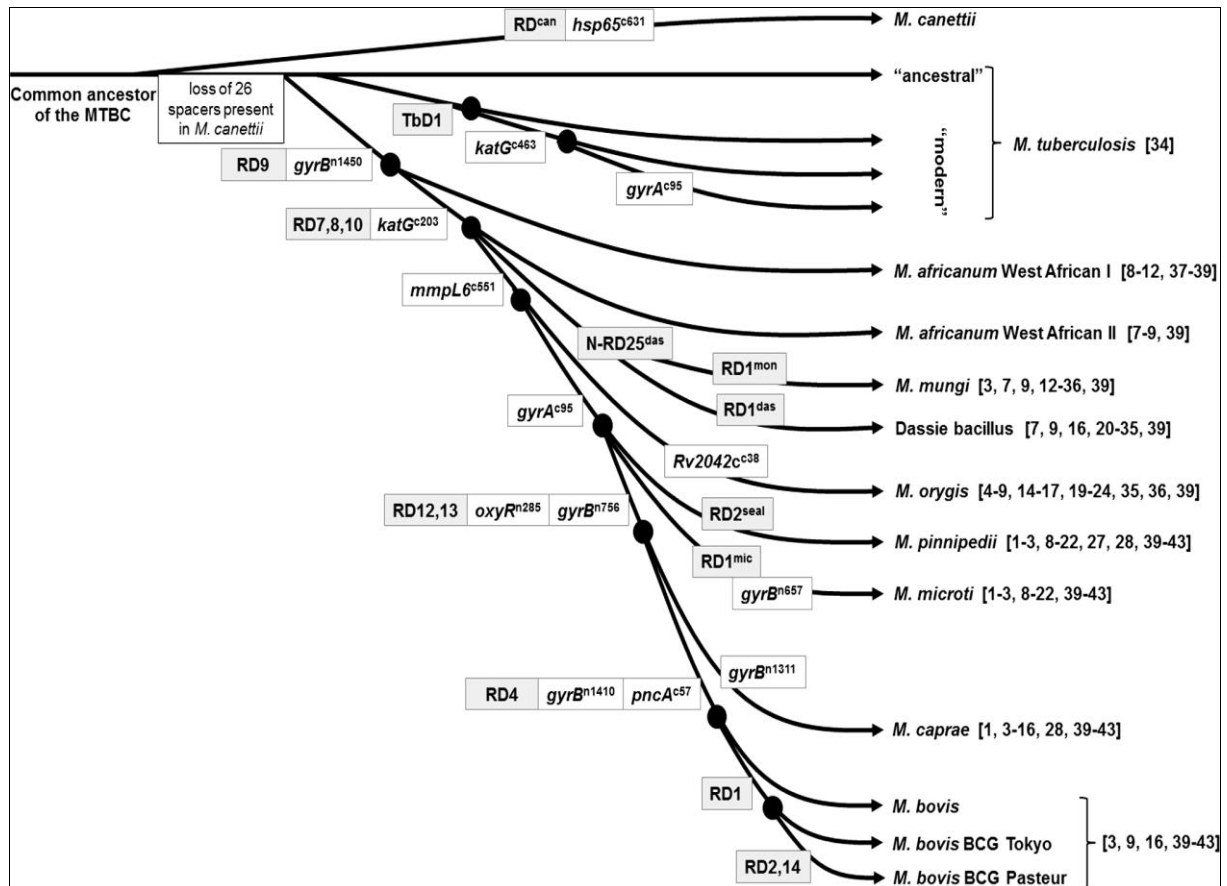


Figure 4 : Phylogénie des souches de CMT basée sur les régions de différence et les SNPs
(Rodriguez-Campos et al., 2014)

b. Typage par technique RFLP-IS6110

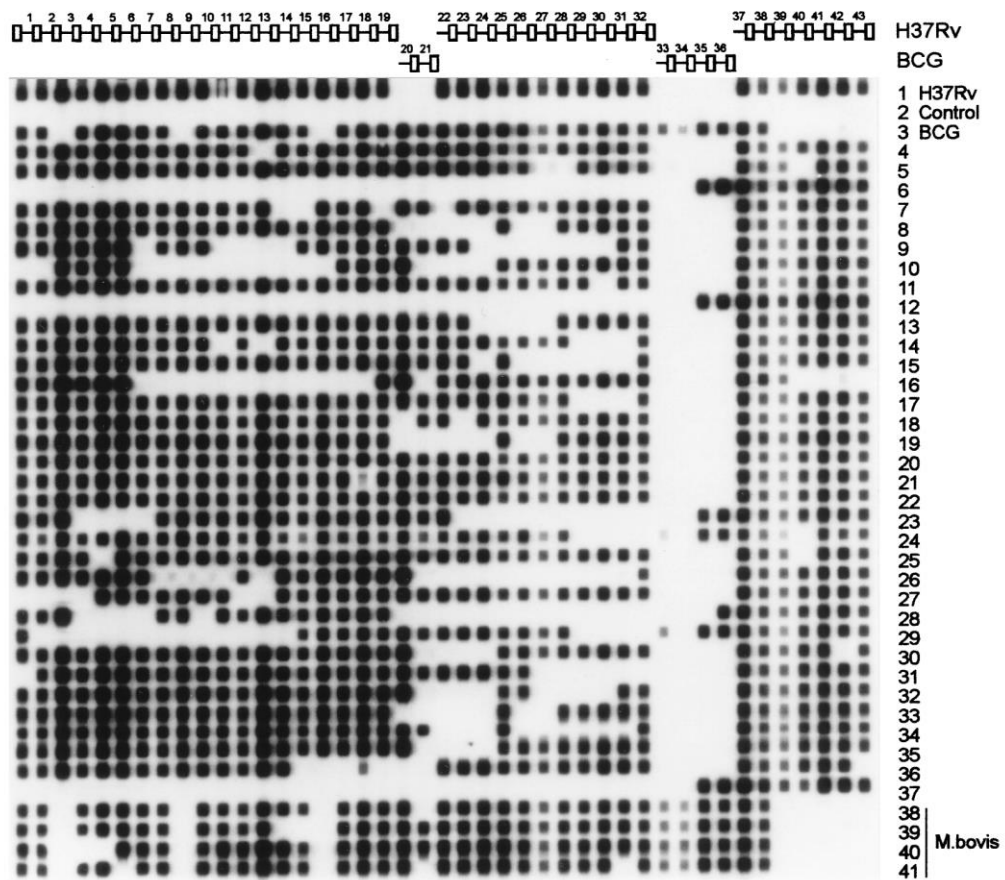
Les séquences d'insertion (IS) correspondent à de petits éléments génétiques transposables présents dans le génome bactérien. L'IS6110 est retrouvée dans le génome de tous les membres du CMT (Thierry et al., 1990). C'est l'un des marqueurs les plus utilisés en PCR pour le diagnostic de la tuberculose. Cette cible a déjà été utilisée pour la détection de *M. bovis* par PCR dans des échantillons d'animaux (Santos et al., 2015). En effet, ces séquences d'insertion sont en nombre et positions variables selon les souches (Veziris et al., 2004), ce qui constitue une source de polymorphisme, ainsi l'IS6110 est également utilisée pour le typage des bactéries du CMT par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Les résultats sont fournis, après extraction d'ADN, digestion par une endonucléase, électrophorèse, transfert sur membrane et hybridation (Van Soolingen et al., 1991). L'IS6110 est la séquence d'insertion la plus abondante dans le génome de *M. tuberculosis*, qui en contient de 1 à plus de 25 copies (Thierry et al., 1990).

Néanmoins, la technique RFLP-IS6110 est beaucoup moins discriminante pour les souches à faible nombre d'insertions (**Allix et al., 2006**), comme *M. bovis* qui n'en contient qu'une à cinq copies (**Van Soolingen et al., 1991**). De plus, le résultat est obtenu en plusieurs jours et nécessite un volume important d'ADN et des manipulations fastidieuses. De ce fait, cette technique a été remplacée par d'autres méthodes telles que le spoligotypage et les MIRU-VNTR.

c. Le spoligotypage

Mis au point par **Kamerbeek et al. (1997)**, le spoligotypage est actuellement l'une des approches les plus fréquemment utilisées pour étudier l'épidémiologie et la phylogénie des mycobactéries du complexe *tuberculosis* (**Jagielski et al., 2014**). De l'anglais Spacer Oligo Nucleotide Typing, son principe s'appuie sur le polymorphisme du locus DR (Direct Repeat) (**Couvin et Rastogi, 2014**). Les souches du complexe *tuberculosis* contiennent une région chromosomique particulière et unique caractérisée par des séquences répétées et bien conservées de 36 pb représentées par le locus DR, séparées par des séquences uniques et polymorphes de 35 à 41 pb appelées espaceurs. Ce polymorphisme, associé à la délétion de certains espaceurs par des réarrangements génétiques est exploité dans le spoligotypage. Par exemple, les espaceurs 3, 9, 16 et 39 à 43 sont absents chez *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* et *M. pinnipedii* (**Smith et al., 2006**), alors que le profil de la souche BCG montre l'absence de trois espaceurs de plus et chez *M. tuberculosis* les espaceurs 3-9-16-et 39 à 43 sont présents (**Figure 5**).

Les espaceurs sont amplifiés grâce à deux amorces spécifiques du segment DR, a et b. L'amorce a est marquée pour permettre de visualiser par une réaction immuno-histochimique l'hybridation des espaceurs amplifiés sur une membrane. Sur cette membrane, sont fixés au préalable, de façon covalente, 43 oligonucléotides correspondant aux 43 espaceurs (oligospacers). S'ils sont présents, les espaceurs amplifiés de l'isolat se lieront à la ligne de la membrane correspondante, après dépôt des produits PCR de cet isolat sur une ligne perpendiculaire à la ligne de dépôt des oligospacers (**Kamerbeek et al., 1997**). La recherche des espaceurs permet d'obtenir un profil traduit en un code binaire à 43 entrées (0= absent, 1= présent). La présence d'un espaceurs amplifié se traduit par l'apparition d'une tâche noire à l'intersection de la ligne des oligospacers et des produits PCR. Une même membrane permet ainsi d'étudier simultanément jusqu'à 45 isolats (**Haddad et al., 2002**).



27

Ainsi, grace au spoligotypage, plus de 39 609 profils provenant de 122 pays ont été collectés dans la base de données internationale de spoligotypage SpolDB4 (**Brudey et al., 2006 ; Von Groll et al., 2010**). En raison de sa simplicité, de son format de résultats binaires et de sa grande reproductibilité, le spoligotypage est très utilisé pour l'épidémiologie moléculaire du CMT (**Couvin et Rastogi, 2014**). Toutefois, cette méthode présente une plus faible résolution que le typage par MIRU-VNTR ou encore par la méthode des restrictions enzymatiques, limitant son utilité dans certaines investigations (**Kao et al., 2016**). De plus le spoligotypage ne présente pas un pouvoir de résolution suffisant pour la différenciation de certains groupes clonaux car il ne cible qu'un seul locus sur l'ensemble du génome.

d. Typage par MIRU-VNTR

Pour pallier le manque de discrimination du spoligotypage, un typage sur différents loci a été développé : le MLVA (Multi Locus VNTR Analysis), basé sur l'analyse d'éléments situés sur des séquences intergéniques (les MIRU : Mycobacterial interspersed Repetitive Unit) composés de séquences variable répétées en tandem dont le nombre est variable, appelé VNTR (Variable Number Tandem Repeat) (**Supply et al., 2001**).

L'étude de loci dispersés dans le génome apporte une discrimination robuste des souches. Le génotypage des souches de *M. tuberculosis* ou *M. bovis* par la méthode MIRU-VNTR repose sur la recherche du nombre d'exemplaires des séquences répétées de chaque locus étudié. Plus le nombre de loci analysés est important, plus la discrimination est fine.

Ainsi, **Frothingham et Meeker-O'Connell (1998)** ont identifié six loci VNTR (ETR-A à F) pour le typage des mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Le MIRU-VNTR peut aussi porter sur 12, 15 ou 24 loci pour le typage (**Supply et al., 2001 ; Supply et al., 2006**).

Dans cette technique, le locus contenant un nombre variable de séquences répétées en tandem est amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques et la taille du produit est déterminée par électrophorèse sur gel (**Figure 6**). Le nombre de copies de l'unité de répétition est calculé en fonction de la taille de l'amplicon PCR (**Rajwani et al., 2018 ; Wagari, 2016**).

Le résultat final du typage par VNTR est fourni par un code numérique qui correspond au nombre de répétitions dans le locus cible et sert d'empreinte digitale pour chaque isolat. Ce format simple facilite l'échange et la comparaison efficaces et fiables des résultats de génotypage, à la fois localement et dans le monde entier (**de Beer et al., 2012**).

Différentes bases de données internationales sont disponibles pour la comparaison des résultats de spoligotypage et de MIRU-VNTR comme SpolDB4, SITVITWEB, MIRU-VNTRplus et Mbovis.org (**Couvin et Rastogi 2014 ; Smith et Upton 2012**).

La technique MIRU-VNTR est plus rapide que l'analyse RFLP, facile à interpréter et reproductible entre laboratoires (**Duignan et al., 2012**). Le typage par VNTR est devenu le nouveau test standard pour le typage des souches de CMT, en raison de son délai d'exécution court, de la comparaison simplifiée des résultats digitaux et de son applicabilité à de petites quantités d'ADN (**de Beer et al., 2012**). Bien que le VNTR donne un degré de discrimination plus élevé que le spoligotyping, les meilleurs résultats sont obtenus en combinant les deux techniques (**Durr et al., 2000**).

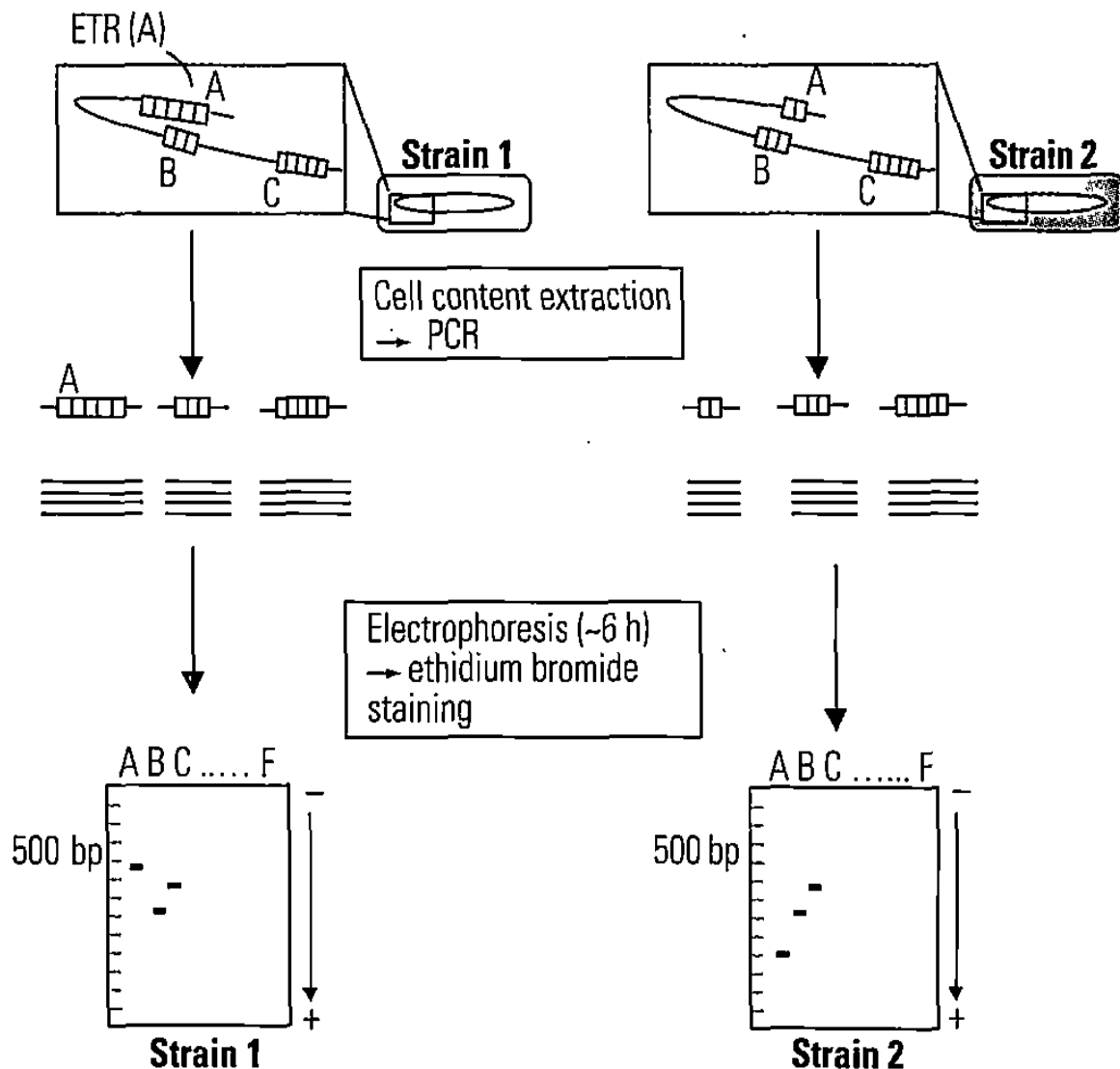


Figure 6 : Schéma des principales étapes de la détection du polymorphisme génétique par la technique MIRU-VNTR (**Durr et al., 2000**)

e. Séquençage génomique

Le séquençage d'ADN est le processus qui consiste à déterminer l'ordre précis des nucléotides dans une molécule d'ADN. Il comprend toute méthode ou technologie permettant de déterminer l'ordre des quatre bases (adénine, guanine, cytosine et thymine) dans un brin d'ADN (**Bolaños et al., 2017**).

➤ Séquençage génomique partiel

Plusieurs gènes cibles sont utilisés pour la discrimination et la classification des espèces de mycobactéries, tels que le *hsp65* (**Senna et al., 2008**). Malgré cela, le séquençage partiel ne permet pas de discriminer les différentes bactéries du CMT à cause de la forte conservation des séquences, le séquençage d'un grand nombre de gènes est nécessaire pour une meilleure discrimination des espèces (**Böddinghaus et al., 1990**), ce qui n'est pas réalisable en routine.

➤ Séquençage du génome complet

A l'heure actuelle, une nouvelle génération de méthodes de séquençage ou NGS (Next Generation Sequencing) a été mise au point (**Iketleng et al., 2018**). Les plateformes NGS permettent des séquençages massifs simultanés et totaux du génome WGS (Whole Genome Sequencing). Le séquençage complet du génome (WGS) bénéficie depuis quelques années de nouvelles technologies plus rapides et moins coûteuses que la méthode de Sanger. Ces techniques ont révolutionné le génotypage en fournissant le plus haut niveau de discrimination génétique possible. Différentes technologies peuvent être utilisées pour le séquençage complet du génome (**Desikan et Narayanan, 2015**) :

- Le pyroséquençage 454
- Technologie PGM (Ion Personal Genome Machine)
- Technologie Illumina

Ces techniques, parfois couplées au typage par SNP, permettent de suivre la dynamique de transmission de la maladie et d'évaluer la divergence génétique des souches qui présentent les mêmes profils de restriction ou de génotypage (**Schürch et van Soolingen, 2012**). Une étude irlandaise sur des souches de *M. bovis* isolées de bovins et de blaireaux vivant dans les mêmes zones a permis grâce au WGS et à l'analyse de 39 SNPs de démontrer la circulation et la persistance locales d'une souche entre animaux sauvages et domestiques (**Biek et al., 2012**). Dans un futur proche, le séquençage du génome complet sera probablement l'outil qui offrira l'information la plus complète sur le génotype des souches, les liens phylogénétiques entre souches et qui permettra de décoder les schémas de

transmission de l'infection entre les animaux (**Biek et al., 2012 ; Rodriguez-Campos et al., 2014**).

f. Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)

Les SNP ou Single Nucleotide Polymorphism correspondent à des mutations ponctuelles d'une base dans un génome. Ces mutations sont relativement rares et apparaissent lors d'erreurs au cours de la réplication d'ADN ou en conséquence d'endommagement de l'ADN (**Stucki et Gagneux, 2013**). Elles peuvent être synonymes (le changement de base n'affecte pas la séquence protéique correspondante) ou non synonymes (la séquence protéique est affectée) et représentent une variabilité du génome qui sera utile pour la caractérisation de la variabilité d'un groupe clonal et l'étude des relations phylogénétiques entre les souches (**Mathema et al., 2006**).

g. Puces à ADN (Microarrays)

Les puces à ADN ou ARN sont utilisées pour la comparaison de génomes complets des espèces du CMT et ont notamment été utilisées pour l'étude de l'expression de gènes de virulence chez *M. bovis* (**Voskuil et al., 2004**), ainsi que sur l'identification de séquences polymorphiques distinguant les principaux complexes clonaux (**Berg et al., 2011 ; Müller et al., 2009**). Ces techniques appartiennent toutefois au domaine de la recherche et ne sont pas utilisées en routine.

II.3 Risque zoonotique lié à *M. bovis*

Le principal agent infectieux impliqué dans la tuberculose zoonotique chez l'homme est *M. bovis* (**Thoen et al., 2006**), dans une moindre mesure *M. caprae* (**EFSA, 2014**) et *M. microti* (**Panteix et al., 2010**). Historiquement, *M. bovis* a été associé à la tuberculose extra pulmonaire chez les enfants, généralement due à la consommation de lait non pasteurisé ou non bouilli de bovins infectés (transmission indirecte) (**Thoen et al., 2006**). La transmission par aérosols respiratoires est également décrite lors de contacts rapprochés avec des animaux domestiques ou sauvages infectés (transmission directe) (**Ayele et al., 2004**). L'infection est sporadiquement rapportée chez des éleveurs de bovins et de cerfs (**Smith et al., 2004**), du personnel vétérinaire (**Shrikrishna et al., 2009**) et du personnel d'abattoir (**Liss et al., 1994**). Le traitement repose sur l'administration d'antituberculeux classiques, à l'exception du pyrazinamide pour lequel *M. bovis* est naturellement résistant.

Il faut noter que la transmission interhumaine de *M. bovis* par voie respiratoire reste rare (**de la Rua-Domenech et al., 2006**). Malgré quelques cas régulièrement décrits chez

l'homme, la tuberculose à *M. bovis* est une zoonose mineure dans les pays développés, notamment en Europe (**Michel et al., 2010**). La situation est très différente dans les pays en voie de développement, à cause de l'absence de programme de lutte contre la tuberculose notamment dans les pays où la maladie est endémique chez les bovins, tels que certains pays d'Afrique, d'Amérique du sud et d'Asie (**Ayele et al., 2004**). Selon **Cachafeiro-Vilar et al. (2007)** la prévalence de l'infection par *M. bovis* chez l'homme représente moins de 0,5% de tous les isolats de mycobactéries. Les données montrent que la tuberculose zoonotique représente environ 2,8 % des cas de tuberculose en Afrique (de 0 à 37,7 % selon les pays), 0,3 % des cas sur le continent américain (de 0 à 33,9 %) et 0,4 % des cas en Europe (de 0 à 21,1 %) (**Müller et al., 2013**).

II.3.1 Facteurs de risques de l'infection zoonotique

La tuberculose était considérée principalement comme une maladie des enfants, où elle touchait les ganglions lymphatiques cervicaux, le tractus intestinal ou les méninges (**O'Reilly et Daborn, 1995**). Cela est lié probablement à l'immaturité du système immunitaire ou bien à l'absence de vaccination par le BCG. L'infection est principalement diagnostiquée chez des personnes âgées et/ou immunodéprimées (diabète, traitement immunosuppresseur, alcoolisme) (**Delaune et al., 2012**).

Le risque zoonotique augmente dans les zones où la tuberculose est endémique et où les personnes vivent dans des conditions favorisant le contact direct avec des animaux infectés ou des produits d'origine animale (**Olea-Popelka et al., 2016**). Dans certaines régions d'Afrique, les communautés exposées à un risque plus élevé de tuberculose à *M. bovis* sont notamment celles vivant à l'interface du bétail, qui consomment principalement du lait cru non pasteurisé et des produits laitiers issus de bovins présentant un statut non contrôlé de tuberculose (**Michel et al., 2010**).

L'infection au VIH et la tuberculose sont étroitement liées, les personnes atteintes de VIH sont plus prédisposées à développer la tuberculose durant leur vie que les personnes VIH négatif (**WHO, 2015**). Dans certains pays de l'Afrique, l'incidence de la tuberculose chez l'homme a augmenté ces dernières années en raison de l'impact de l'épidémie de VIH (**Grange et al., 1994 ; Ayele et al., 2004**). La pauvreté et le manque d'accès aux soins sont des facteurs de dissémination de la tuberculose humaine et zoonotique dans ces pays (**Ayele et al., 2004 ; WHO, 2014**). Il faut noter que dans les pays en voie de développement, le diagnostic de laboratoire de *M. bovis* chez l'homme s'arrête parfois à l'observation

microscopique de BAAR, sous-estimant probablement l'occurrence de *M. bovis* chez l'homme (Michel et al., 2010).

II.3.2 Mode de transmission de l'infection zoonotique

L'infection humaine par *M. bovis* peut se faire par plusieurs voies (Figure 7), l'inhalation d'aérosols ou consommation de produits d'origine animale contenant le bacille (Grange, 2001). La voie cutanée de transmission est plus rarement décrite dans la littérature scientifique.

- Voie digestive

L'infection par *M. bovis* chez l'homme peut se faire par l'ingestion de lait de vache non pasteurisé ou de produits laitiers (Palacios et al., 2016) notamment le fromage (Sandoval-Azuara et al., 2017). La viande crue ou insuffisamment cuite provenant d'animaux infectés peut également être une source d'infection (Dean et al., 2018).

- Voie respiratoire

L'infection humaine par *M. bovis* peut se faire par la voie respiratoire à travers le contact avec des aérosols de bovins infectés, ce qui peut entraîner une tuberculose typique (Wedlock et al., 2002). Les données épidémiologiques suggèrent la probabilité de transmission interhumaine de *M. bovis* par voie aérienne chez les patients atteints de la forme pulmonaire, mais sa contribution dans de nouvelles infections chez l'homme est inconnue (LoBue et al., 2004).

- Voie cutanée

Des infections par voie cutanée ont été décrites lors d'écorchures suite à un contact avec des carcasses d'animaux présentant des lésions de tuberculose (de la Rua-Domenech, 2006).

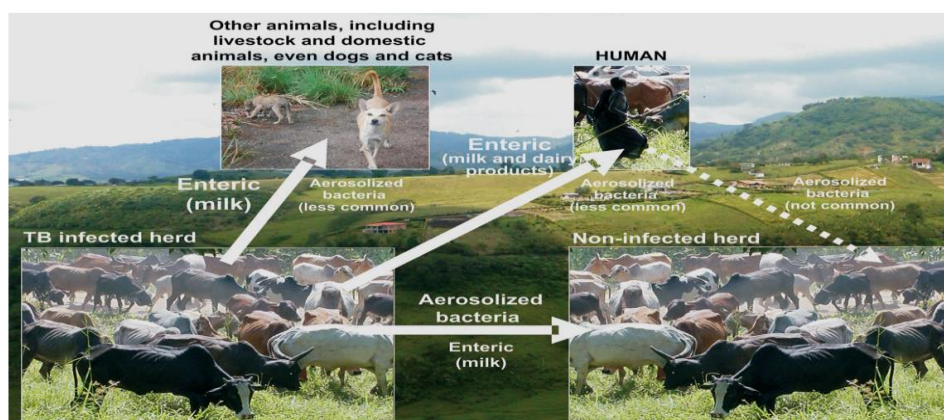


Figure 7 : Principaux modes de transmission de *M. bovis* entre les animaux et l'homme (Rodriguez-Morales et Castañeda-Hernández, 2014).

II.4 Surveillance et lutte contre la tuberculose bovine

La présence d'obstacles à l'éradication de la tuberculose est probablement liée à la combinaison de plusieurs facteurs (**Perez et al., 2011**), parmi lesquels :

- La nature chronique et la longue période d'incubation de la maladie.
- Le manque de ressources financières et humaines suffisantes pour contrôler la maladie.
- L'absence de vaccin efficace.
- L'absence d'immunité naturelle protectrice contre l'infection.
- La réinfection par des réservoirs d'animaux sauvages.
- L'échec dans la conception et la mise en œuvre des tests de diagnostic et des schémas de contrôle.

A partir des données bibliographiques, des mesures de lutte selon un programme et un plan de protection rigoureux doivent être envisagés et évalués.

II.4.1 Mesures offensives

Les programmes nationaux de lutte contre la tuberculose reposent sur le diagnostic chez les animaux vivants, par le biais de tests menés sur l'ensemble du troupeau et l'élimination des animaux infectés (**Pollock et al., 2003**). Il faut noter que la politique de test et d'abattage a conduit à l'éradication ou à une réduction importante de l'incidence de la tuberculose dans un certain nombre de pays développés, dont l'Australie, l'Amérique du Nord et l'Europe (**Wedlock et al., 2002**).

- Le dépistage de l'infection par tuberculation : l'utilisation répétée des tests tuberculiniques reste la base de tous les programmes de contrôle de la tuberculose à ce jour (**Good et al., 2018**).
- L'assainissement : élimination des animaux réagissant positivement au test cutané et désinfection des locaux et du matériel à usage des animaux. Les mangeoires et les abreuvoirs doivent être nettoyées et soigneusement désinfectées avec un désinfectant à base de phénol à 5 % ou du crésol (**Woolhouse et al., 1997**).

II.4.2 Mesures défensives

- La maîtrise du risque lié à l'introduction : mise en quarantaine stricte de tout animal importé d'un autre État ou pays.
- La maîtrise du risque lié au voisinage : les mouvements d'animaux provenant d'exploitations infectées doivent être contrôlés afin d'empêcher la propagation de la maladie (**Wedlock et al., 2002**).

- La surveillance par inspection systématique des carcasses à l'abattoir : celle-ci doit concerner tous les bovins abattus pour la consommation humaine. Elle repose sur l'inspection d'un certain nombre d'organes cibles (poumons, nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens, trachéobronchiques et médiastinaux). Dans le cas de lésions suspectes visibles, celles-ci doivent être prélevées et transmises à un laboratoire agréé pour recherche de mycobactéries par culture et éventuellement par PCR.
- Le contrôle de l'état sanitaire des bovins faisant objet d'une transaction commerciale.
- La pasteurisation du lait.
- La réalisation d'enquêtes épidémiologiques en cas de découverte d'un foyer de tuberculose dans une région donnée.
- Le suivi et l'évaluation du programme de contrôle et d'éradication doit être effectué en permanence pour établir son état d'avancement et son efficacité et ainsi apporter les modifications et les corrections nécessaires en cas de défaillance.

En France, dans le contexte de lutte contre la tuberculose, le ministère de l'Agriculture a créé en septembre 2011 un dispositif national de surveillance de la tuberculose dans la faune sauvage non captive, nommée Sylvatub (**Rivière et al., 2017**). Ce dispositif a pour objectif principal la détection de la présence de *M. bovis* chez les animaux sauvages à savoir les cerfs, chevreuils, sangliers et blaireaux. Les données de Sylvatub permettent d'affiner les connaissances scientifiques sur le rôle épidémiologique des espèces sensibles et d'aider les autorités sanitaires à mettre en œuvre des mesures de lutte adéquates pour la sécurisation des élevages.

II.4.3 Le concept « One Health »

Suite à la découverte du bacille tuberculeux par Robert Koch en 1882, le contrôle de la tuberculose humaine bénéficia de découvertes liées au domaine vétérinaire, exemple de la tuberculine et le vaccin BCG. Ces découvertes représentent une des premières étapes et un des piliers de l'approche « One Health » en ce qui concerne la tuberculose (**Michel, 2014**). La collaboration à caractère scientifique, les enquêtes d'épidémiologie moléculaire à travers le secteur médical et vétérinaire démontrent le début d'une approche « One Health » (**Michel, 2014**).

- ✦ Le défi « One Health » invite à développer de nouveaux concepts sur les agents pathogènes, la pathogenèse, l'immunologie comparative des différents hôtes, la dynamique épidémiologique et à comprendre le rôle des facteurs environnementaux dans chacun des divers systèmes (**Miller et Olea-Popelka, 2013**). Ce paradigme unifié

convient parfaitement au contrôle de la tuberculose. L'approche « One Health » met l'accent sur les relations entre la santé humaine, la santé animale et la santé environnementale en augmentant la communication et la collaboration entre les différentes disciplines (**Kahn, 2011**).

- ↗ One Health est un concept émergent qui met l'accent sur les liens entre la santé humaine, animale et environnementale, ainsi que la nécessité d'une communication et d'une collaboration interdisciplinaires pour aborder les questions de santé, notamment les zoonoses émergentes, les effets du changement climatique et le lien entre l'homme et l'animal (**Rabinowitz et al., 2017**)
- ↗ Le partage des ressources et l'intensification des interactions entre la santé publique et les vétérinaires, et la population scientifique, peut sensibiliser et augmenter la conscience vis-à-vis du « risque commun » de tuberculose entre l'homme et l'animal (**Thoen et al., 2016**).
- ↗ L'introduction des tests cutanés à la tuberculine a marqué le début de la lutte contre la tuberculose en détectant et en éliminant les troupeaux de bovins infectés. Cette stratégie de contrôle basée sur l'association test-abattage, combinée à la mise en œuvre de la pasteurisation obligatoire du lait, constitue probablement l'approche la plus vaste et la plus efficace du principe « One Health » dans l'histoire du contrôle de la tuberculose zoonotique (**Michel, 2014**).
- ↗ L'approche « One Health » a été reconnue comme un élément majeur des stratégies de contrôle et de prévention des maladies par des organismes internationaux, notamment la FAO, l'OIE et l'OMS (**Lee et Brumme, 2013**).
- ↗ Des recherches communes sur la santé humaine et animale peuvent accélérer efficacement la mise au point de nouveaux tests de diagnostic pour l'homme et le bétail et améliorer les programmes de surveillance, de contrôle et d'éradication de la tuberculose. L'utilisation du principe « One Health » pour les collaborations interdisciplinaires/multidisciplinaires offre une approche précieuse pour toutes les régions du monde (**Thoen et al., 2016**).

Deuxième partie : partie expérimentale

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Objectifs de l'étude

Les objectifs visés par notre étude sont :

- ↗ L'évaluation de la prévalence des lésions de tuberculose bovine dans les abattoirs objets de l'étude.
- ↗ Une contribution à la connaissance de l'épidémiologie de la tuberculose bovine, notamment par l'étude de quelques facteurs de variations liés à la maladie (sexe, âge et saison).
- ↗ L'isolement des mycobactéries responsables de tuberculose bovine à partir de prélèvements sur carcasses bovines présentant des lésions suspectes de tuberculose lors de l'inspection vétérinaire sanitaire post-mortem.
- ↗ La caractérisation moléculaire des souches isolées par Spoligotypage et MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeat).
- ↗ La détermination de l'indice de discrimination de Hunter-Gaston (HGDI) des loci évalués pour l'ensemble des souches obtenues, ainsi que la détermination du pouvoir discriminant des deux techniques de typages utilisées.

Notre partie expérimentale se présente en trois grandes étapes :

- La première porte sur l'inspection vétérinaire sanitaire post-mortem aux abattoirs, elle concerne la détection des carcasses bovines présentant des lésions suspectes de tuberculose. Au cours de cette étape des prélèvements sont soigneusement récoltés.
- La deuxième étape concerne l'isolement de l'agent pathogène (*M. bovis*) sur milieu de culture spécifique.
- Dans la troisième étape nous nous sommes intéressés à la caractérisation moléculaire des isolats de *M. bovis* par deux techniques de typage : le Spoligotypage (Technique de microarrays) et 19 loci MIRU-VNTR.

I. Matériel et méthodes

I.1 Matériel

Pour la prise des prélèvements, l'isolement des souches et l'examen microscopique nous avons utilisé des ustensiles et du matériel usuel de laboratoire. Quand au typage moléculaire nous avons utilisé des réactifs et du matériel spécifique aux techniques citées précédemment.

🔧 Matériel non biologique

- Anse en plastique à usage unique
- Bistouris
- Ciseaux en acier inoxydable
- Lame à bistouris à usage uniques
- Lame en verres
- Micropipettes : 100 µl, 200 µl, 1000 µl
- Mortier avec pilon en porcelaine
- Pinces en acier inoxydable
- Pipettes Pasteur
- Pots de prélèvements 50ml
- Sable
- Tubes Eppendorf
- Tubes coniques 50ml
- Acide sulfurique 25%
- Agarose (Sigma, Allemagne)
- Alcool 95 %
- Amorce VNTR (MWG Eurofins, Germany)
- Amorces: RD9_FlankF, RD9_FlankR, RD9_InternalR et biotinylées-5'DRa/DRb
- Bromure d'éthidium
- dNTP-Mix (10mM)
- Eau distillée stérile
- Fuchsine basique 1%
- HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Germany)
- Kit d'extraction d'ADN (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Life Science, USA).
- Kit d'hybridation (Alere, Cat.245200100)
- Lysozyme
- Marqueur de poids moléculaire (Peqlab, 1000pb)
- MgCl₂ (25mM)
- Milieu de culture de Löwenstein-Jensen incliné en tube de 10ml (IPA)
- NaOH 4%
- Protéinase K (Qiagen, Allemagne)

- Solution Q (Qiagen, Allemagne)
- Tampon 10×concentré (Qiagen, Allemagne)
- Taq-polymerase (Taq PCR Core Kit, Qiagen, Germany)
- Tris Acétate-EDTA (TAE) 10×concentré (Sigma, FLI)
- Agitateur de Kahn (marque, IPA)
- Agitateur thermostaté
- Autoclave
- Bain ultrasonique
- Centrifugeuse
- Congélateur -20°C
- Etuve 37°C
- Hotte microbiologique
- Lecteur ArrayMate™ (Alere technologie, GmbH, Germany)
- Nanodrop
- Réfrigérateur 4°C
- Thermoblock
- Thermocycleur
- Transilluminateur à UV
- Vortex

Matériel biologique

- ADN *M. bovis* BCG (DSMZ 43990, ATCC 27289)
- ADN *M. tuberculosis* (H37Rv)
- ADN *M. bovis*
- ADN *M. caprae*

I.2 Méthodes

I.2.1 Zone de collecte et lieu de l'étude

Les prélèvements d'origine animale ont concerné des carcasses bovines présentant des lésions suspectes de tuberculose bovine durant la période 2013 à 2017, provenant de 4 abattoirs différents situés dans la région d'Alger : Hussein-Dey et El-Harrach au centre d'Alger, Hadjout dans la région Nord-ouest et Dellys dans la région Est d'Alger.

Les analyses de laboratoire ont été réalisées dans deux établissements, le premier est situé en Algérie, il s'agit du laboratoire de Référence des Mycobactéries et Contrôle de

l'Antibiorésistance de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), le second est situé en Allemagne, il s'agit du Laboratoire National de Référence de la Tuberculose Bovine en Allemagne (Jena), Institut de Pathogénie Moléculaire (IMP), Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) (**Figure 8**).

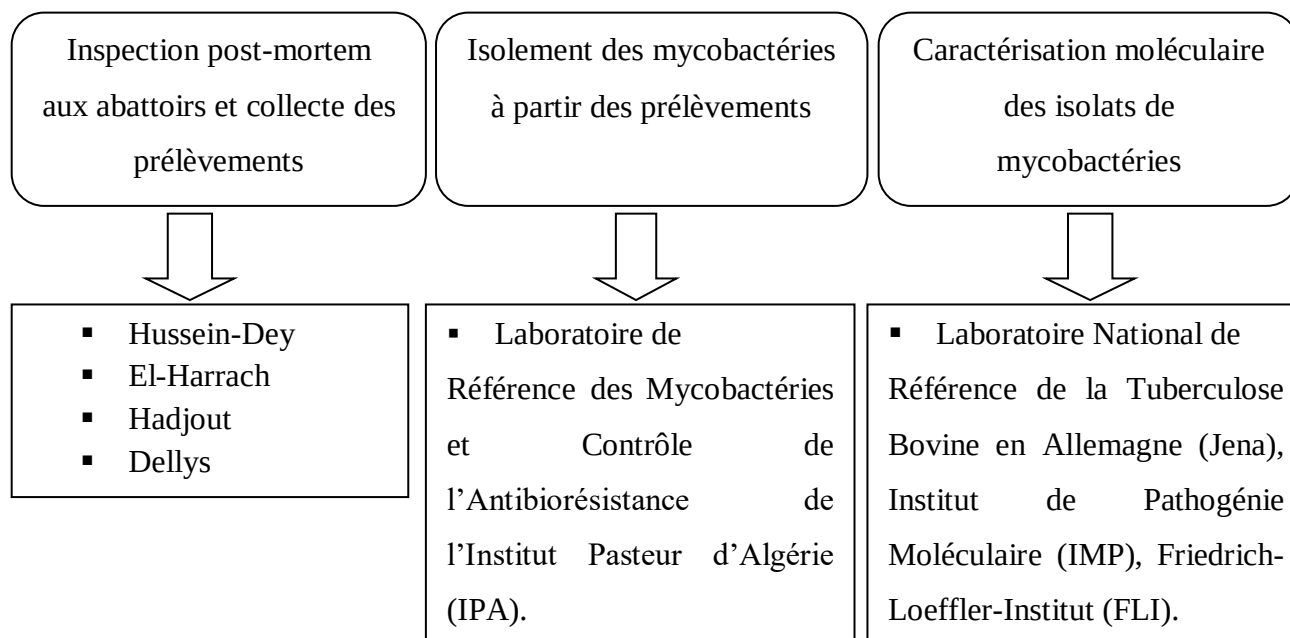


Figure 8 : Diagramme du plan de travail expérimental

I.2.2 Inspection vétérinaire post mortem et prises de prélèvements

Pour la réalisation des prélèvements, une inspection post-mortem sur les zones d'élection est conduite selon les propres techniques conduites par le vétérinaire de chaque établissement (**Figure 9**), sur l'ensemble des carcasses de bovins abattus (**Tableau 6**).

- Sur un nombre total de 3848 carcasses bovines inspectées, 184 prélèvements ont été réalisés durant la période d'étude. Les prélèvements concernent les organes lésés, représentés essentiellement par les poumons, les ganglions lymphatiques et le foie.
- Les échantillons sont collectés à l'aide d'un bistouri stérile à usage unique puis transférés dans des flacons stériles de 50 ml à usage unique fermés hermétiquement.
- Chaque pot de prélèvement est identifié avec les informations suivantes : date du prélèvement, âge et sexe de l'animal ainsi que la localisation de la lésion.



Figure 9 : Inspection d'un foie de bovin présentant des lésions suspectes de tuberculose
(Photo personnelle)

Tableau 6 : Nombre de carcasses bovines inspectées et nombre de prélèvements collectés et analysés par abattoir.

Abattoir	Bovins Inspectés (No)	Prélèvements réalisés (No)	Prélèvements analysés (No)
Hussein Dey	2207	98	41
El-Harrach	1167	62	40
Hadjout	344	17	17
Dellys	130	7	7
Total	3848	184	105

Après échantillonnage, les prélèvements sont acheminés sous régime de froid dans une glacière directement depuis l'abattoir à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), pour être conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

I.2.3 Mesures générales de précaution

Des mesures particulières de protection sont respectées tout au long de la manipulation des produits pathologiques et des cultures bactériennes. Toutes les manipulations sont effectuées sous hotte microbiologique à flux laminaire. La désinfection du plan de travail se fait rigoureusement avec un produit non corrosif et adéquat.

☞ Lors de chaque manipulation des mycobactéries au laboratoire, nous portons une tenue adéquate spécialement conçue pour la manipulation de germes dangereux à savoir : des gants, un masque type FFP2, une surblouse, une charlotte et des surchaussures.

- ✦ Les liquides et les pipettes ne sont rejetés qu'après séjour prolongé dans un récipient contenant un liquide antiseptique.
- ✦ Les ustensiles de travail (Pincettes et bistouris) sont stérilisés régulièrement par autoclavage.
- ✦ En dehors des heures de travail, la stérilisation des hottes et des plans de travail, est assurée par des lampes germicides (UV).

I.2.4 Traitement des échantillons et mise en culture

Cette partie est réalisée au Laboratoire de Référence des Mycobactéries et de Contrôle de l'Antibiorésistance de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), elle comporte 4 étapes :

- Décontamination des tissus
- Réalisation des frottis
- Mise en culture des échantillons
- Contrôle de l'aspect des colonies obtenues.

Par manque de moyens, notamment le manque de milieu de culture utilisée pour les mycobactéries, sur les 184 prélèvements récoltés, seuls 105 échantillons ont été soumis à la culture bactérienne.

a. Décontamination des prélèvements

Toutes les étapes sont réalisées sous hotte microbiologique à flux laminaire devant un bec Bunsen.

- Le prélèvement est déposé dans une boîte de Pétri stérile, une observation est faite sur la globalité du tissu. A l'aide de pincettes et de ciseaux, le tissu est sectionné en deux pour la recherche d'autres lésions suspectes (**Figure 10**).

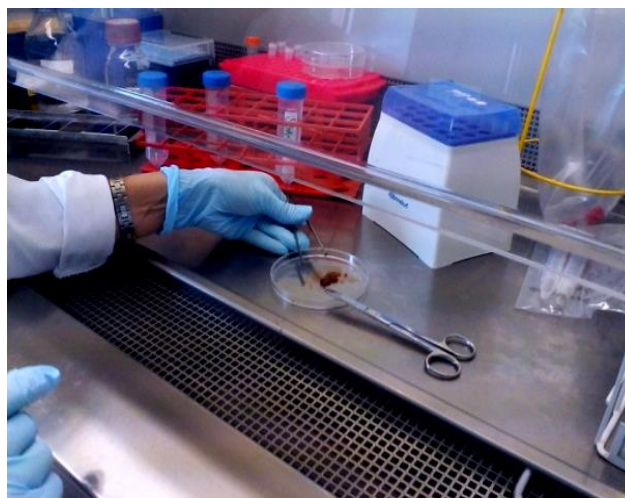
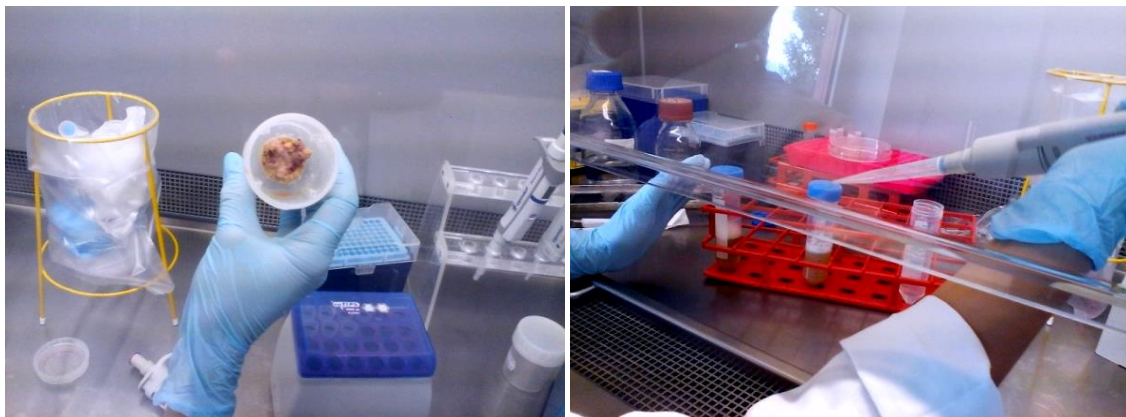


Figure 10 : Préparation du prélèvement pour le traitement au laboratoire
(Photo personnelle)

- A l'aide d'un bistouri muni d'une lame à usage unique, 10g de tissu sont prélevés pour être analysés. L'échantillon de 10g est transféré dans un mortier stérile avec pilon et coupé en petits morceaux.
- La technique de Pettrof modifiée est utilisée pour la décontamination du tissu (**Kent et Kubica, 1985, Tripathi et al., 2014**), elle comprend les étapes suivantes :
 - Le tissu est broyé dans du sable à l'aide du pilon.
 - Le broyat est transféré dans un tube conique de 50ml (**Figure 11**).
 - A l'aide d'une pipette graduée, 5ml de NaOH à 4% sont ajoutés au broyat.
 - Le mélange est incubé pendant 15mn dans un agitateur de Kahn à température ambiante. La réaction est ensuite neutralisée à l'eau distillée stérile.
 - La suspension est centrifugée à deux reprises pendant 20mn à 3000xg.
 - Le surnageant est jeté et le culot est gardé, ce dernier sera utilisé comme inoculum dans le milieu de culture (**Figure 11**).



**Figure 11 : Broyage et décontamination du prélèvement
(Photo personnelle)**

b. Examen microscopique direct

Pour la recherche des BAAR, un frottis sur lame est confectionné pour tous les échantillons. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile quelques gouttes de la suspension bactérienne sont déposées sur la lame, celle-ci est séchée sous hotte, puis fixée par 3 passages rapides à la chaleur à l'aide du bec Bunsen. La méthode de Ziehl-Neelsen (**Annexe 1**) (**OIE, 2018**) est utilisée pour la coloration des frottis (**Figure 12**).

- La lame est posée sur une grille, puis est recouverte de fuchsine phéniquée à 1% jusqu'à immersion totale.
- A l'aide du bec Bunsen et d'un coton imbibé d'alcool, la lame est chauffée par le dessous jusqu'à émission de vapeurs sans ébullition.

- Laisser agir l'alcool et la chaleur pendant 3mn puis chauffer lentement jusqu'à émission de vapeur. L'opération est répétée 3 fois, puis un rinçage à l'eau est effectué.
- Recouvrir la lame d'acide sulfurique à 25% pendant 2 mn, puis laver à l'eau.
- Recouvrir la lame d'alcool à 95° pendant 3 mn puis laver à l'eau.
- Recouvrir la lame de bleu de méthylène pendant 30 secondes, puis laver à l'eau et laisser sécher.



**Figure 12 : Coloration des frottis par la méthode de Ziehl- Neelsen
(Photo personnelle)**

La lecture se fait par observation des lames au microscope optique sous immersion. Les mycobactéries apparaissent généralement sous forme de bâtonnets fins colorés en rose sur fond bleu. Il faut noter que le résultat de l'examen microscopique ne peut jamais conclure à la présence de bacilles tuberculeux, mais simplement à la présence de BAAR.

c. Culture des mycobactéries

Dans cette partie, nous avons fait appel à des méthodes d'isolement classiques des mycobactéries selon le protocole mis en place par l'Institut Pasteur d'Algérie.

- A partir du culot de la suspension bactérienne décontaminée, 0,5ml sont prélevés à l'aide d'une pipette Pasteur etensemencés dans des tubes en pyrex de 10ml contenant le milieu de Löwenstein-Jensen à l'œuf additionné de glycérine (**Annexe 2**).
- Les cultures sont incubées dans une étuve régulée à 37°C. Elles sont maintenues en position inclinées bien aérées pendant les 3 premiers jours, ensuite fermées pendant 8 à 12 semaines, le temps requis pour la culture des mycobactéries du CMT.
- Les mycobactéries atypiques peuvent avoir un temps de culture plus court (1 semaine à 15 jours) ce qui les différencie des mycobactéries du CMT, comme ils peuvent avoir

un temps de culture plus long (1 mois), durée requise pour *M. bovis*. Pour cela, la lecture des cultures se fait quotidiennement durant la première semaine pour vérifier d'éventuelles contaminations, puis une fois par semaine pour le reste de la durée d'incubation, avant de déclarer les cultures négatives.

d. Contrôle de l'aspect et de la pureté des colonies

Cette étape est très importante car les contaminants peuvent interférer avec les résultats des tests d'identification. Si la culture est contaminée, un repiquage dans un autre tube de Löwenstein- Jensen est réalisé. Cette étape permet aussi l'identification des colonies grâce au caractère et à l'aspect qui peut être rugueux (Rough) ou lisse (Smooth) (type R ou S).

I.2.5 Caractérisation moléculaire des isolats

Cette partie a été réalisée au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose Bovine en Allemagne, ville de Jena, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis (IMP). Toutes les cultures positives, soit 60 souches ont fait objet d'une analyse par la technique de spoligotypage, alors que 42 souches ont fait l'objet d'une analyse par la méthode 19 loci MIRU-VNTR.

A/ Identification des souches par PCR-RD9

Dans un premier temps nous avons réalisé une PCR pour la recherche de la présence ou de l'absence de la région de délétion RD9. Le but de cette étape est de confirmer que les souches de mycobactéries obtenues appartiennent au complexe tuberculosis (CMT). Cette partie est réalisée selon les étapes suivantes :

a. Extraction d'ADN

Nous avons utilisé la technique de lyse cellulaire par chauffage, décrite par **Berg et al. (2009)** pour l'extraction d'ADN :

- A partir des tubes de Löwenstein-Jensen, un maximum de colonies est prélevé délicatement à l'aide d'une anse en plastique stérile. Les colonies sont déposées dans des tubes contenant 500µl d'eau distillée stérile (**Figure 13**).
- A partir des suspensions bactériennes de 500µl, 50µl sont prélevés dans un tube Eppendorf.
- Les tubes de la suspension bactérienne subissent un traitement par sonication dans un bain ultrasonique à 95°C pendant 10mn.

- Après traitement aux ultrasons, les suspensions bactériennes sont chauffées par un traitement thermique à 100°C au thermoblock pendant 10mn.
- Après traitement thermique, les suspensions bactériennes de 50µl sont centrifugées, le surnageant est récupéré et transféré dans un autre tube Eppendorf. Celui-ci est centrifugé à 12.000 rpm pendant 5mn. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré et transféré dans un autre tube Eppendorf.

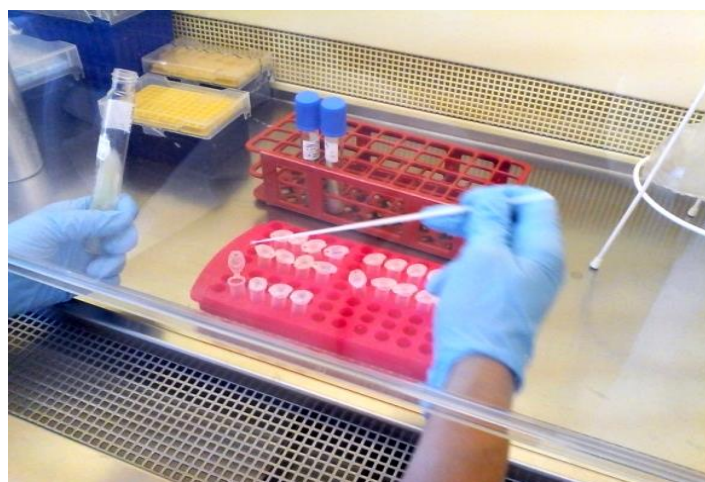


Figure 13 : Préparation des suspensions bactériennes pour l'extraction d'ADN
(Photo personnelle)

b. Préparation du Mix PCR

Les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 7. Nous avons utilisé le protocole PCR-RD9 décrit par **Berg et al. (2009)** pour la préparation du Mix PCR-RD9 (**Tableau 8**). Les ADN de *M. bovis* DSMZ 43990, ATCC 27289 et de *M. tuberculosis* H37Rv sont utilisés comme témoins positifs dans la PCR-RD9 et un échantillon d'eau comme témoin négatif.

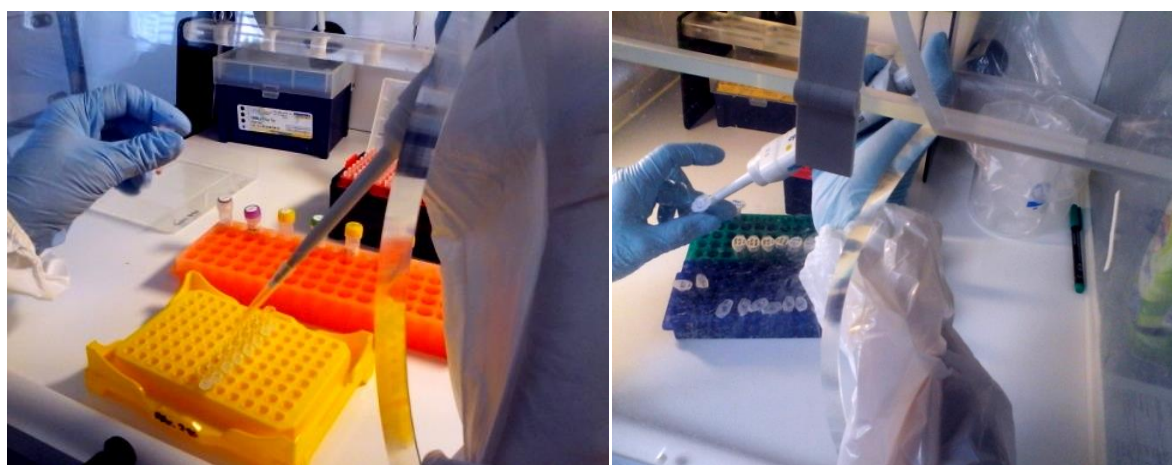
Tableau 7 : Tailles des produits PCR-RD9 et amorces utilisées pour l'identification des souches isolées (**Berg et al., 2009**).

Locus	Amorce	Séquence	Présent (<i>M.tuberculosis</i>)	Absent (<i>M.bovis</i>)
RD 9	RD9_FlankF	AACACGGTCACGTTGTCGTG		
	RD9_FlankR	CAAACCAGCAGCTGTCGTTG	396	575
	RD9_InternalR	TTGCTTCCCCGGTTCGTCTG		

La préparation du mélange réactionnel Mix est effectuée dans une salle propre non contaminée par les acides nucléiques. Le mélange du Mix aux échantillons d'ADN se fait dans une autre salle (PCR Template) (**Figure 14**).

Tableau 8 : Composition du mélange réactionnel de la PCR-RD9.

Réactif	Volume (µl)
RD9_Flank f (100pmol/µl)	0,5
RD9_Flank r (100pmol/µl)	0,5
RD9_Internal (100pmol/µl)	0,5
Tampon (10×concentré)	2
dNTP-Mix (10mM)	0,4
MgCl ₂ (25mM)	0,4
Taq-polymerase	0,2
Slution Q	4
H ₂ O	10,5
DNA	1
Volume final	20

**Figure 14 :** Préparation du Mix PCR-RD9 et mélange avec les échantillons d'ADN**(Photo personnelle)****c. Amplification d'ADN**

Les tubes contenant les échantillons d'ADN sont placés dans un thermocycleur, le programme d'amplification est effectué en 3 étapes :

- ✓ La dénaturation à 95°C pendant 1 mn
- ✓ L'hybridation à 60°C pendant 1 mn
- ✓ L'extension à 72°C pendant 1 mn

Le dernier cycle est suivi d'une extension (Elongation) terminale à 72°C pendant 10mn.

d. Electrophorèse sur gel d'agarose

- Une solution d'agarose à 1,5% est préparée avec le Tris Acétate-EDTA (TAE) 10× concentré (Sigma), chauffée jusqu'à dissolution complète puis refroidie à 60°C ; puis 2 gouttes de bromure d'éthidium sont rajoutées.
- L'agarose est ensuite coulée dans un moule monté sur cassette munie d'un peigne à 12 ou 22 cupules. Après polymérisation, le gel est immergé dans une solution de TAE.
- Un volume de 8µl du produit d'amplification est déposé dans chaque cupule, ainsi que le marqueur de taille (Peqlab, 1000pb).
- Les produits amplifiés sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% à 110V pendant 1 heure (**Figure 15**).

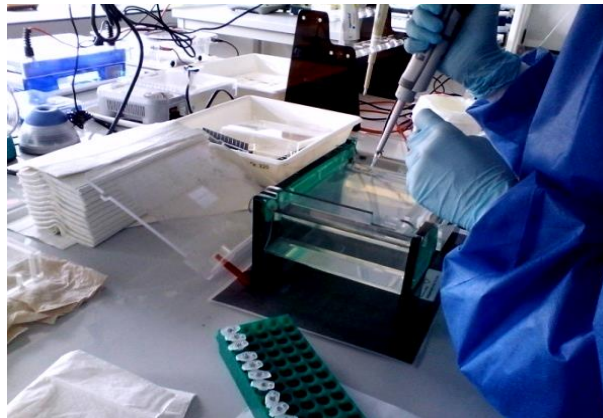


Figure 15 : Electrophorèse des produits d'amplification sur gel d'agarose
(Photo personnelle)

A la fin de la migration des ADN, le gel est visualisé grâce à un transilluminateur à UV, une photo du gel est prise (**Figure 16**).

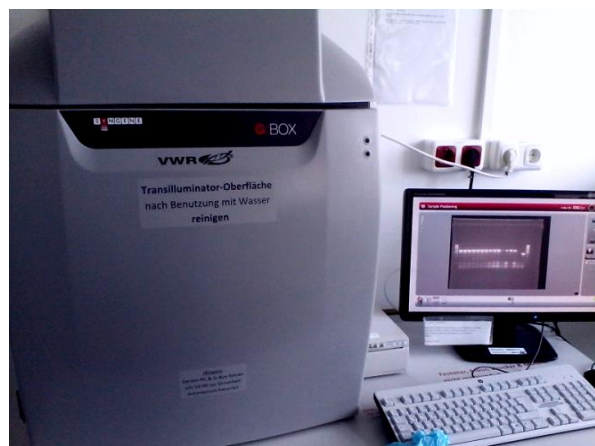


Figure 16 : Visualisation du gel d'agarose avec le transilluminateur à UV
(Photo personnelle)

B/Typage moléculaire des isolats de *M. bovis*

Après identification des souches par PCR-RD9, il a été procédé à leur typage moléculaire au moyen de deux techniques. La première étape dans la caractérisation moléculaire est l'extraction d'ADN.

a. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée en utilisant le Kit d'extraction High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Life Science (USA) (**Annexe 3**). Les étapes d'extraction sont comme suit (**Figure 17**) :

- Des suspensions bactériennes de 200µl sont préparées et chauffées pendant 15mn à 100°C, et agitées au vortex toutes les 5 mn.
- 15µl du lysozyme sont ajoutés aux suspensions bactériennes.
- Le mélange est incubé pendant 60mn à 37°C, en agitant toutes les 20 mn manuellement.
- 200µl du tampon de liaison et 40µl de protéinase K sont ajoutés au mélange lysozyme-suspensions bactériennes.
- Le mélange est incubé pendant 30mn à 56°C, en agitant toutes les 10mn au vortex.
- Le mélange est incubé une fois encore pendant 10mn à 72°C.
- 100µl d'isopropanol sont rajoutés et agités au vortex.
- La totalité du mélange est versée dans des colonnes et centrifugée durant 1mn à 8000xg.
- Le mélange est filtré dans de nouveaux tubes.
- 500µl du tampon d'élimination des inhibiteurs sont ajoutés, puis centrifugés durant 1mn à 8000xg.
- Filtrer dans de nouveaux tubes et ajouter 500µl de tampon de lavage.
- Centrifuger 1mn à 8000xg, puis filtrer dans de nouveaux tubes.
- Rajouter 500µl de tampon de lavage et centrifuger 1mn à 8000xg puis filtrer dans des nouveaux tubes.
- Ajouter 50µl de tampon d'élution aux colonnes contenues dans des tubes et centrifuger 1mn à 8000xg.
- Ajouter une deuxième fois 25µl de tampon d'élution et centrifuger 1mn à 8000xg.
- Jeter les colonnes et garder les tubes contenant l'ADN.
- Conserver les ADN à -20°C.

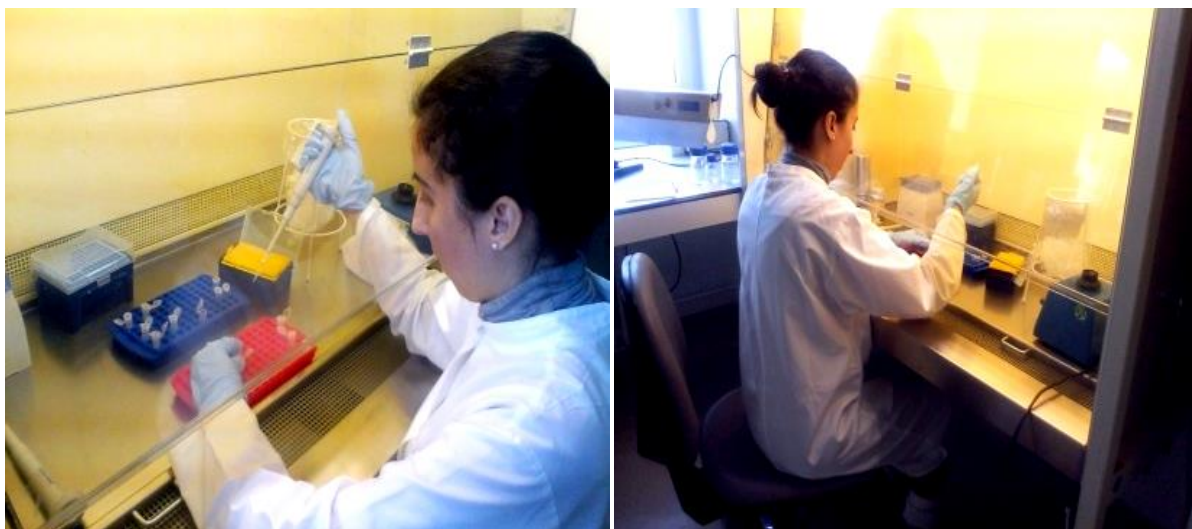


Figure 17 : Extraction d'ADN
(Photo personnelle)

Après extraction, les ADN sont quantifiés par Nanodrop (**Figure 18**), avant d'être typés par spoligotypage.



Figure 18 : Quantification d'ADN par Nanodrop
(Photo personnelle)

b. Typage moléculaire par spoligotypage

La technologie des microarrays sur barrettes (Array-stripe), ou biopuces a été utilisée. Chaque barrette est constituée de huit puits avec une micropuce (4,36 mm × 4,36 mm) fixée au fond de chaque puits. Les barrettes sont assemblées sur un cadre de 96 puits (**Figure 19**). Les puces sont des matrices de verre sur lesquelles sont fixées de courtes séquences nucléotidiques appelées sondes (probes), organisées en unités d'hybridation, chaque unité contient plusieurs millions d'exemplaires de la même sonde.

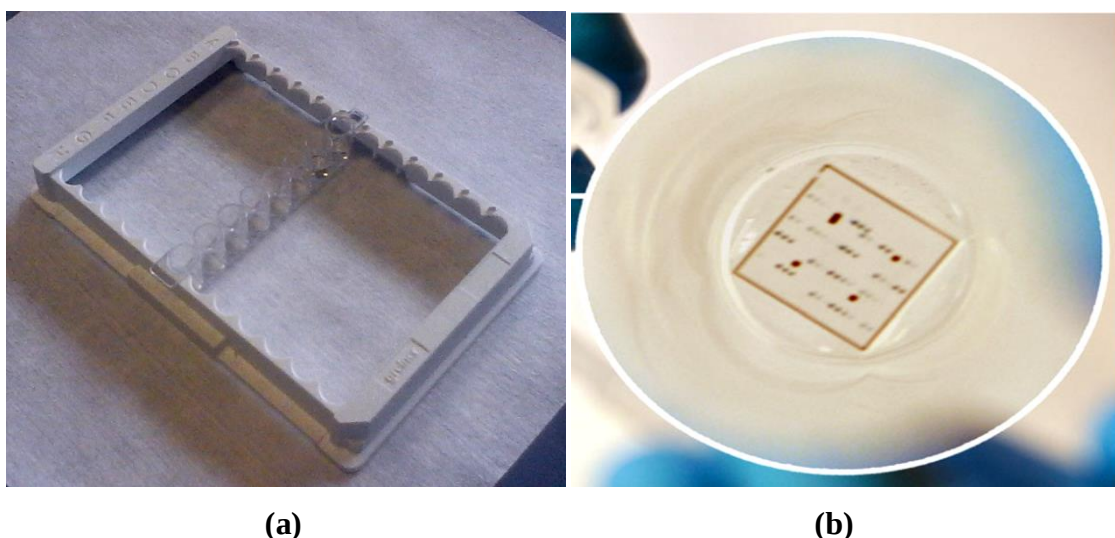


Figure 19 : Système microarrays utilisé sur barrettes (Array-strip) (a) (Photo personnelle)

Le cercle blanc montre une image agrandie de la puce fixée au fond de chaque puits de la barrette (b) (Lorec et al., 2020).

Les ADN extraits sont marqués à la biotine puis déposés sur la puce. Ils se fixent dans les unités d'hybridation où se trouvent les sondes qui leur sont spécifiques. Les ADN sont ensuite révélés à l'aide d'un fluorochrome, et l'intensité de la fluorescence émise par chaque unité est mesurée par un module de criblage (**Figure 20**). L'intensité de fluorescence émise dépend du nombre de molécules d'ADN spécifiquement appariées.

Nous avons utilisé la technique de spoligotypage basée sur le format de microarrays d'ADN de la plateforme ArrayStrip (Alere Technologies GmbH [actuellement Abbott], Jena, Allemagne) selon les instructions du fabricant, comme décrit par **Ruettger et al. (2012)**. En bref, après extraction de l'ADN, les régions DR du génome bactérien sont amplifiées à l'aide d'amorces biotinylées-5' DRa/DRb (**Kamerbeek et al., 1997**), puis hybridées sur la micropuce. Les matrices sont à la fin scannées et analysées par l'ArrayMate™.

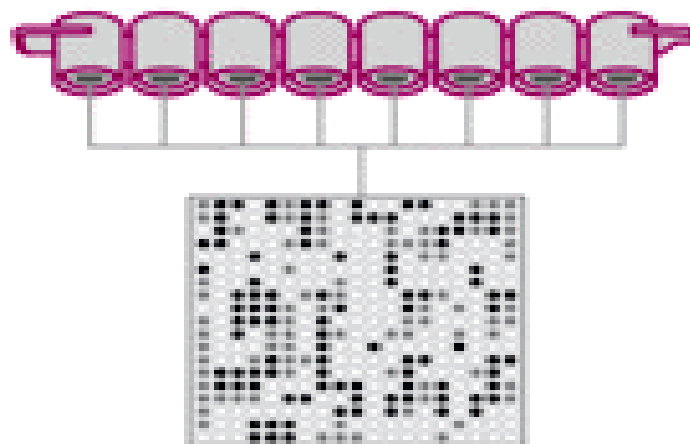


Figure 20 : Schéma représentatif du principe des microarrays (ArrayStrip)

Cette technique est réalisée en suivant plusieurs étapes développées ci-dessous :

➤ **Préparation du mix PCR (DRa/DRb)**

Les oligonucléotides DRa et DRb 5'-biotinylés sont utilisées comme amorces pour amplifier la région DR par PCR.

DRa : 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3'

DRb : 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'

La PCR est réalisée en mélangeant les réactifs comme décrit dans le tableau 9. Deux témoins positifs sont utilisés : le *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis* H37Rv.

Tableau 9 : Préparation du mélange réactionnel de la PCR DRa/DRb

Réactif	Volume (µl)
DRa (20pmol/µl)	2
DRb (20pmol/µl)	2
Tampon (10×concentré)	2
dNTP-Mix (10mM)	0,5
MgCl ₂ (25mM)	0,2
Solution Q	4
Taq-polymerase	0,2
H ₂ O	3,1
DNA	6
Volume final	20

➤ **Amplification des régions DR 5'-biotinylés**

Les AND biotinylés sont amplifiés selon un programme d'amplification en 3 étapes :

- ✓ Dénaturation à 96°C pendant 1 mn
- ✓ Hybridation à 55°C pendant 1 mn
- ✓ Extension à 72°C pendant 30 secondes

Une électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%, 1 heure à 110V) est réalisée avec visualisation des produits d'amplification grâce à un transilluminateur à UV et prise de photo du gel (**Figure 21**).

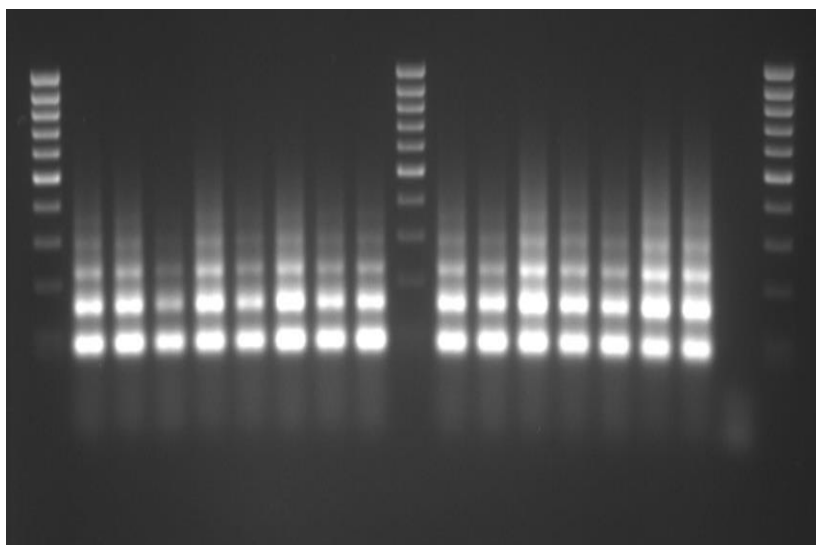


Figure 21 : Visualisation des produits d'amplification des ADN biotinylés
(Photo personnelle)

Après amplification, les ADN biotinylés sont hybridés à des sondes ADN spécifiques fixées à la surface de la cupule :

➤ **Hybridation**

Nous avons utilisé le kit d'hybridation d'Alere Technologies, (Hybridization Kit, Cat 245200100) (**Annexe 4**). Dans la présente technique les réactions sont effectuées dans des ArrayStrip ou barrettes constituées de 8 cupules. A la surface de chacune de ces cupules, sont fixées de façon covalente, des sondes de 43 oligonucléotides correspondant aux 43 espaceurs (Oligospacers) sur lesquels les ADN biotinylés viennent se fixer (**Figure 22**).



Figure 22 : Hybridation des produits PCR
(Photo personnelle)

➤ Préparation de la mixture d'hybridation :

- Dans un tube Eppendorf nous rajoutons 90µl du tampon d'hybridation à chaque échantillon de produit d'ADN biotinylés.
- Homogénéiser vigoureusement à l'aide d'un vortex.
- Le mélange est incubé à 95°C pendant 5mn.
- A l'aide d'une micropipette, rincer chaque cupule de la barrette avec 100µl d'eau pure (DNase/RNase Free) sans toucher le fond de la cupule.
- Jeter l'eau de chaque cupule et rajouter 100µl de tampon d'hybridation à chaque cupule. Incuber les échantillons pendant 5mn à 60°C à 550rpm à l'aide d'un agitateur thermostaté.
- A l'aide d'une micropipette récupérer et jeter le tampon d'hybridation de chaque cupule.
- Transférer 100µl de la mixture d'hybridation (ADN biotinylés, tampon d'hybridation) dans chaque cupule. Respecter le sens de la lecture de la barrette en suivant le code barre.
- Incuber la barrette à 60°C pendant 60mn à 550rpm dans un agitateur thermostaté.
- Après hybridation jeter le surnageant de chaque cupule à l'aide d'une micropipette.
- Rajouter 200µl de tampon de rinçage dans chaque cupule et incuber 10mn à 55°C, dans un agitateur thermostaté à 550rpm (**Figure 23**).

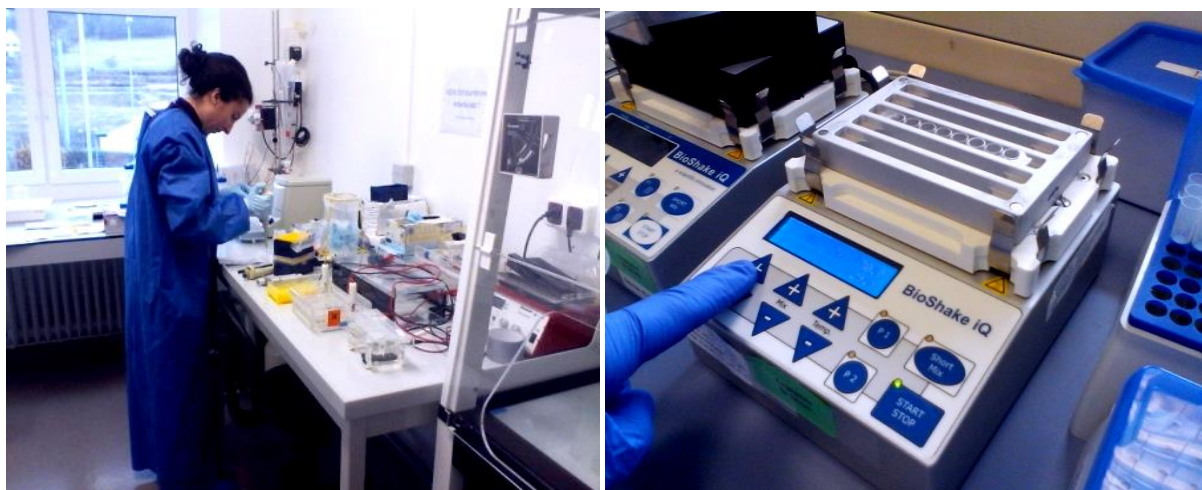


Figure 23 : Incubation des échantillons dans l'agitateur thermostaté
(Photo personnelle)

➤ Le mélange du conjugué-HRP :

- Le conjugué est préparé préalablement en mélangeant 792µl de tampon du conjugué avec 8µl de HRP (peroxidase de raifort) couplés à la streptavidine.
- Rajouter 100µl du mélange HRP-streptavidine et tampon du conjugué dans chaque cupule, incuber 10mn à 30°C, à 550rpm dans un agitateur thermostaté.
- Rejeter le surnageant à l'aide d'une micropipette.
- Rajouter 200µl de tampon de rinçage dans chaque cupule. Aspirer et réaspirer le liquide 4 fois à l'aide de la micropipette à température ambiante.
- Rajouter 80µl de réactif HRP-substrat dans chaque cupule.
- Incuber pendant 10mn à 25°C à l'abri de la lumière.
- Après incubation, récupérer et jeter tout le liquide à partir de chaque cupule. Sécher soigneusement la surface des cupules à l'aide d'un tissu afin d'enlever l'excès de liquide.

c. Acquisition des résultats de spoligotypage

La lecture des résultats est réalisée grâce à l'appareil l'ArrayMate™ transmission reader (Alere technologie, Array strip Wildtech_Spoligotyping_03 Cat 240009853) GmbH (**Figure 24**). L'appareil est équipé d'un PC et d'un logiciel intégré pour la détection et l'analyse d'images en parallèle. L'appareil permet l'enregistrement et l'analyse rapides et automatisés des images générées dans la plate-forme.

- La barrette est déposée dans le lecteur en respectant le sens de la lecture de l'automate. Chaque barrette est munie d'un code barre, point de départ de la lecture des résultats. Les puces à ADN sont scannées et analysées par l'ArrayMate™. Le lecteur permet une visualisation de la puce, il analyse les informations et fournit un résultat concis du test.
- Le software d'Alere Technologies mesure l'intensité du signal de chaque sonde et compare automatiquement les profils de *M. bovis* obtenus à ceux disponibles dans la base de données des spoligotypes de *M. bovis* (www.mbovis.org [Smith et Upton, 2012]) et dans la base de données SITVIT1(www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/index.jsp [Demay et al., 2012]) (Annexe 5).
- Le traitement des données est automatisé et rendu en un code binaire, où le chiffre « 1 » signifie la présence du spacer et le chiffre « 0 » signifie son absence.
- La présence d'une tache sombre indique l'existence d'une hybridation. Les modèles de spoligotypes sont attribués conformément à la nomenclature internationale. Chaque profil de spoligotype unique est nommé par SB suivi de quatre nombres entiers, par ex : SB0120.



Figure 24 : Lecture des résultats de spoligotypage (Microarrays) par l'ArrayMate™
(Photo personnelle)

d. Typage moléculaire par 19 loci MIRU-VNTR

Dans la présente étude nous avons évalué un panel de 19 loci (**Tableau 10**). Le choix des loci a été effectué conformément au panel de 12 loci (**Annexe 6**) proposé sur le site web MIRU-VNTR plus (www.miru-vntrplus.org) en combinaison avec le panel proposé par le Centre Européen de référence pour la tuberculose bovine (EU-RL), Centre de surveillance de la santé VISAVET, Université Complutense de Madrid) pour le typage moléculaire de *M. bovis* (**Annexe 7**).

Tableau 10 : Liste des 19 locus évalués pour le typage de *M. bovis* et les amorces correspondantes.

Locus	Alias	Amorces
154	MIRU02	F : TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT R : TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
577	ETRC	F : CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT R : AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
580	MIRU04 ; ETR D	F : GCGCGAGAGCCCGAACTGC R : GCGCAGCAGAAACGCCAGC
802	MIRU40	F : GGGTTGCTGGATGACAACGTGT R : GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
960	MIRU10	F : GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC R : GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
1644	MIRU16	F : TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA R : CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
2059	MIRU20	F : TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG R : GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
2163b	QUB11b	F : CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG R : CGAAGTGAATGGTGCCAT
2165	ETRA	F : AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT R : CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATT
2461	ETRB	F : GCGAACACCAGGACAGCATCATG R : GGCATGCCGGTGATCGAGTGG
2531	MIRU23	F : CTGTGATGGCCGCAACAAAACG R : AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC
2687	MIRU24	F : CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT R : GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
2996	MIRU26	F : TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC R : CATAGGCGACCAGGCGAATAG
3007	MIRU27 ; QUB 5	F : TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA R : GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
3192	MIRU31 ; ETR E	F : ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA R : GTGCCGACGTGGTCTTGAT
4052	QUB26	F : AACGCTCAGCTGTCCGAT R : CGGCCGTGCCGCCAGGTCCTTCCCGAT
4348	MIRU39	F : CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC R : CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
2163a	QUB11a	F : CCCATCCCGCTTAGCACATTTCGTA R : TTCAGGGGGGATCCGGGA
3232	QUB3232	F : TGCCGCCATGTTTCATCAGGATTAA R : GCAGACGTCGTGCTCATCGATACA

Cette technique repose sur une série de PCR, en utilisant des amorces différentes et spécifiques du loci évalué, les étapes se résument en trois parties :

- Préparation du Mix PCR (**Tableau 11**)
- Amplification et l'électrophorèse des produits PCR
- Lecture et l'interprétation des résultats des MIRU-VNTR

Dans le présent travail, le typage moléculaire des souches de *M. bovis* par MIRU-VNTR a été réalisé selon le protocole décrit par **Kohl et al. (2018)** et selon **Supply et al. (2006)**. Pour le locus VNTR 2461-PCR, les amorces décrites par **Frothingham et al. (1998)** ont été utilisées et pour le locus VNTR 2163a-PCR, les amorces décrites par **Skuce et al. (2002)** ont été utilisées.

➤ Préparation du Mix PCR

Le Mix PCR est préparé avec les réactifs tel que décrit dans le tableau 11.

Tableau 11 : Réactifs et volumes utilisés pour le mélange réactionnel de la PCR pour la technique MIRU-VNTR.

Réactifs	Volume (µl)
Primer VNTR (20pmol/µl)	0,8
Primer VNTR (20pmol/µl)	0,8
Tampon (10×concentré)	2
dNTP-Mix (10mM)	0,8
Hotstar Taq-polymerase	0,1
Solution Q (5×concentré)	4
H ₂ O	10,1
MgCl ₂	0,4
DNA	1
Volume final	20

➤ Amplification et électrophorèse des produits PCR

Les ADN sont amplifiés selon un programme de 3 étapes :

- ✓ Dénaturation à 94°C pendant 1 min
- ✓ Hybridation à 59°C pendant 1 mn
- ✓ Extension à 72°C pendant 120 secondes

La séparation des produits PCR se fait par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5%, 100 V pendant 2 heures 15 mn, puis visualisation des produits d'amplification grâce à un transilluminateur à UV et prise de photo du gel.

e. Lecture et interprétation des résultats de MIRU-VNTR

Cette étape consiste à calculer la diversité allélique de chaque loci évalué pour toutes les souches typées. L'estimation de la diversité allélique est effectuée en calculant l'indice de discrimination de Hunter-Gaston (HGDI) (**Hunter et Gaston, 1988**) selon la formule suivante :

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Où : N est le nombre total de souches dans la population, s est le nombre total de types ou profils décrits, n_j est le nombre de souches appartenant au $j^{\text{ème}}$ type.

La probabilité qu'une souche unique échantillonnée au hasard appartienne au $j^{\text{ème}}$ groupe est n_j/N . La probabilité que deux souches échantillonnées consécutivement appartiennent à ce groupe est $n_j*(n_j - 1) / N*(N - 1)$.

Le HGDI est utilisé pour calculer la diversité allélique pour chaque locus MIRU-VNTR. Nous avons aussi calculé le pouvoir discriminant (HGDI) des deux techniques de typage moléculaire : le spoligotypage et 19 loci MIRU-VNTR ainsi que le HGDI de la combinaison des deux méthodes de typage.

Ainsi, une valeur D de 1,0 indiquerait que le locus évalué ou la méthode de typage est capable de distinguer chaque membre d'une population de souche de tous les autres membres de cette population. À l'inverse, un indice de 0,0 indiquerait que tous les membres d'une population de souche sont d'un type identique.

I.2.6 Analyse statistique et génomique des résultats

Les données obtenues dans la première partie concernant la prévalence et les facteurs de risques, ont été saisies dans des feuilles de calcul Microsoft Excel 2010 et analysées à l'aide du SPSS-Version 20.0. Le test du chi-deux a été utilisé pour analyser les données relatives à la prévalence de la maladie et aux facteurs de risque associés (sexe, âge et saison). L'intervalle de confiance est de 95% pour la détermination de la prévalence et pour l'étude des facteurs de risque. La valeur P a été maintenue à $<0,05$ pour la signification. Concernant la diversité génomique au sein des populations de souches obtenues, celle ci a été analysée par le logiciel BioNumerics (version 7.6.2, Applied Maths, Pays-Bas).

Résultats

II. Résultats

II.1 Prévalence de la tuberculose bovine dans les abattoirs d'études

II.1.1 Prévalence globale

L'analyse des résultats obtenus après inspection post mortem des carcasses dans les abattoirs est représentée par le tableau 12 et illustrés par la figure 25.

Tableau 12 : Prévalence globale des lésions suspectes de tuberculose bovine.

Animaux examinés (Nb)	Carcasses positives (Nb)	Prévalence (%)
3848	184	4,78

Les résultats obtenus (**Tableau 12**) montrent que sur un total de 3848 carcasses bovines examinées dans les quatre abattoirs, 184 carcasses bovines ont présenté des lésions suspectes de tuberculose, ce qui correspond à une prévalence de 4,78% IC (0,04-0,05%) dans le présent travail.

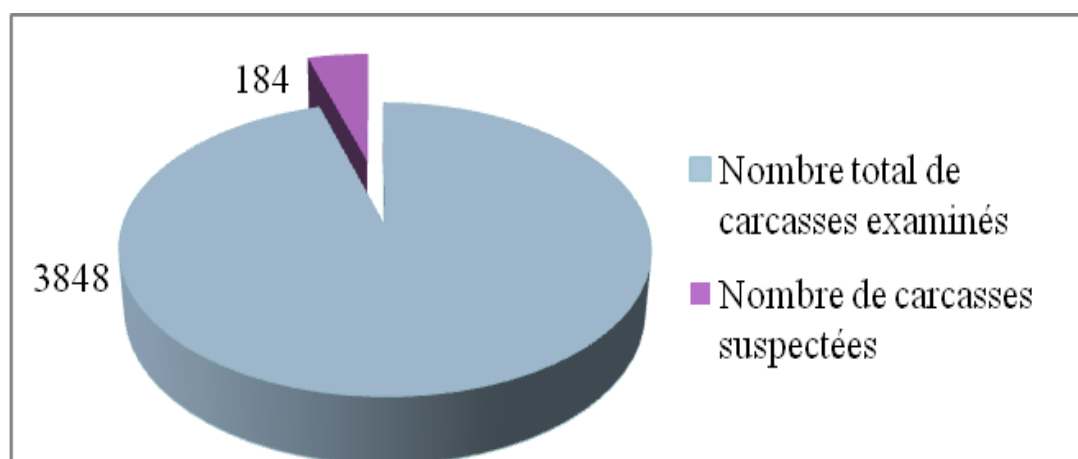


Figure 25 : Prévalence globale des lésions suspectes de tuberculose bovine.

II.1.2 Prévalence par abattoir

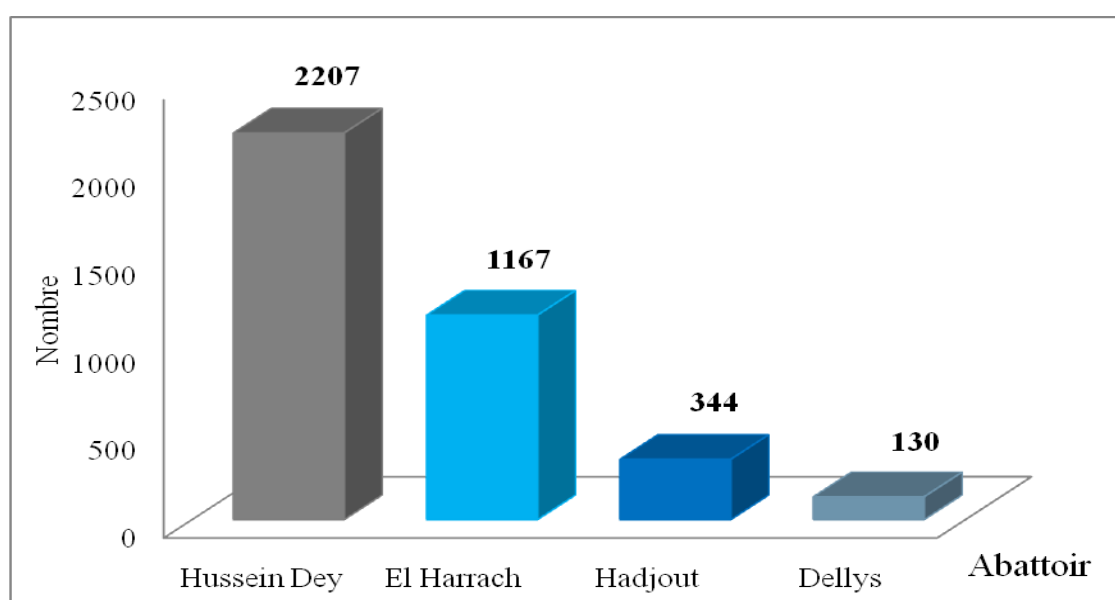
Nous avons calculé la prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine dans chaque abattoir (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine par abattoir.

Abattoir	Carcasses examinés (Nb)	Pourcentage (%)	Carcasses positives (Nb)	Moyenne (%)	Prévalence (%)
Hussein Dey	2207	57,35	98	53,3	4,44
El Harrach	1167	30,33	62	33,7	5,31
Hadjout	344	8,94	17	9,2	4,94
Dellys	130	3,38	7	3,8	5,38
Total	3848	100	184	25	4,78

Les résultats obtenus (**Tableau 13**) montrent que le nombre de carcasses bovines présentant des lésions suspectes de tuberculose est de 98 (53,3%) IC (0,46-0,60%) pour l'abattoir d'Hussein Dey, 62 (33,7%) IC (0,26-0,40%) pour l'abattoir d'El Harrach, 17(9,2%) IC (0,05-0,13%) pour l'abattoir de Hadjout et 7(3,8%) IC (0,02-0,08%) pour l'abattoir de Dellys.

L'analyse des résultats montre une différence significative du nombre de carcasses positives entre les quatre abattoirs ($P < 0,00001$). Le tau d'infection est plus élevé dans l'abattoir d'Hussein Dey, suivi par El Harrach, puis Hadjout et Dellys. Le taux d'infection de la maladie est en moyenne de 25% entre les quatres abattoirs (écart type = 0,74%).

**Figure 26** : Nombre de carcasses bovines examinées dans chaque abattoir.

Les résultats obtenus (**Figure 26**) montrent que le nombre le plus élevé de carcasses bovines examinées est observé dans l'abattoir d'Hussein-Dey (57,35%), suivie par El Harrach (30,33%), Hadjout (8,94%) et enfin Dellys (3,38%).

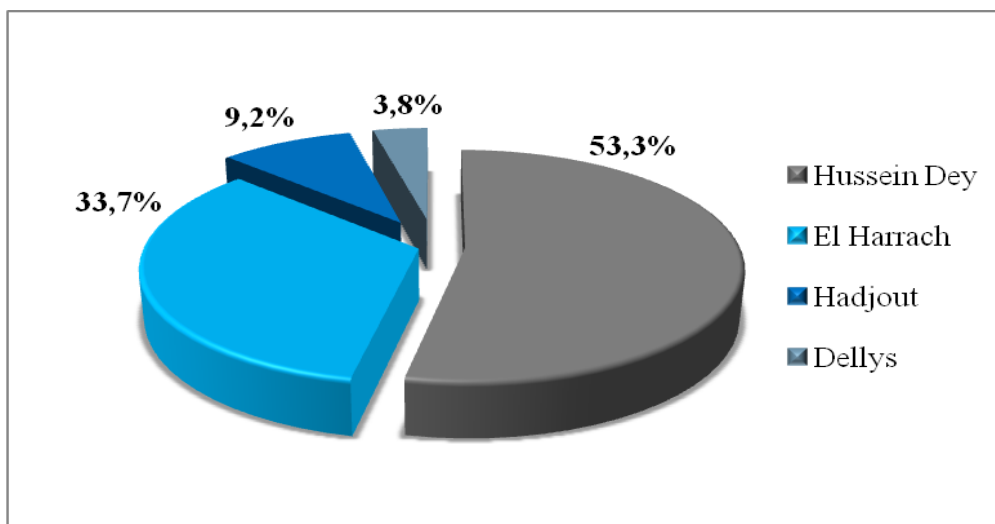


Figure 27 : Pourcentages des lésions suspectes de tuberculose bovine enregistrées par abattoir.

Les résultats obtenus (**Figure 27**), montrent que la moyenne des lésions suspectes de tuberculose bovine obtenue dans la présente étude est de 25% ; ce taux est élevé dans l'abattoir d'Hussein Dey (53,3%), suivi par El Harrach (33,7%), Hadjout (9,2%), avec un faible taux à l'abattoir de Dellys (3,8%).

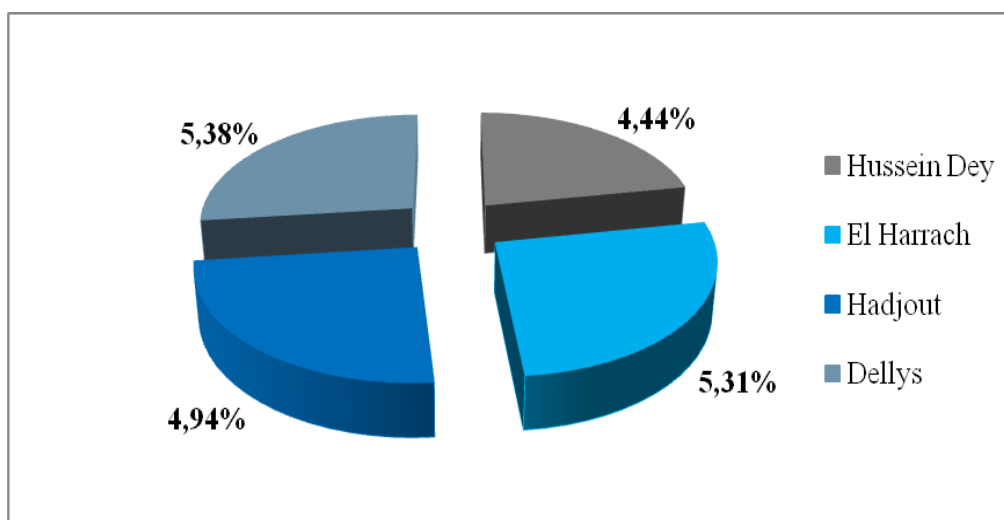


Figure 28 : Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine par abattoir.

Les résultats obtenus (**Figure 28**), montrent que la prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine est relativement similaire entre les quatre abattoirs ; 4,44% pour l'abattoir d'Hussein Dey, 5,31% pour l'abattoir d'El Harrach, 4,94% pour l'abattoir de Hadjout et 5,38% pour l'abattoir de Dellys. Cependant, les prévalences les plus élevées sont notées au niveau des abattoirs de Dellys et El Harrach.

Tableau 14 : Principales localisations des lésions suspectes de tuberculose bovine dans la carcasse.

Localisation	Positifs (Nb)	Prévalence (%)
Cavité thoracique	156	84,8
Tissu hépatique et NL associés	14	7,6
Rein	1	0,5
Appareil digestif	1	0,5
NL préscapulaire	3	1,6
NL rétro-pharyngien	9	4,9
Total	184	100

Les résultats obtenus (**Tableau 14**), montrent que la plupart des lésions suspectes de TB sont anatomiquement localisées dans la région thoracique 156 (84,8%) IC (79,6- 90%). D'autres localisations ont été détectées lors de l'examen des carcasses, telles que le tissu hépatique et les NL associés 14 (7,6%) IC (3,8-11,4%), les NL rétro-pharyngien 9 (4,9%) IC (1,8-8%) et le reste des lésions dans les NL préscapulaire 3 (1,6%) IC (0,01-0,05%), l'appareil digestif 1 (0,5%) IC (0,001-0,03%) ainsi que le rein 1 (0,5%) IC (0,001-0,03%).

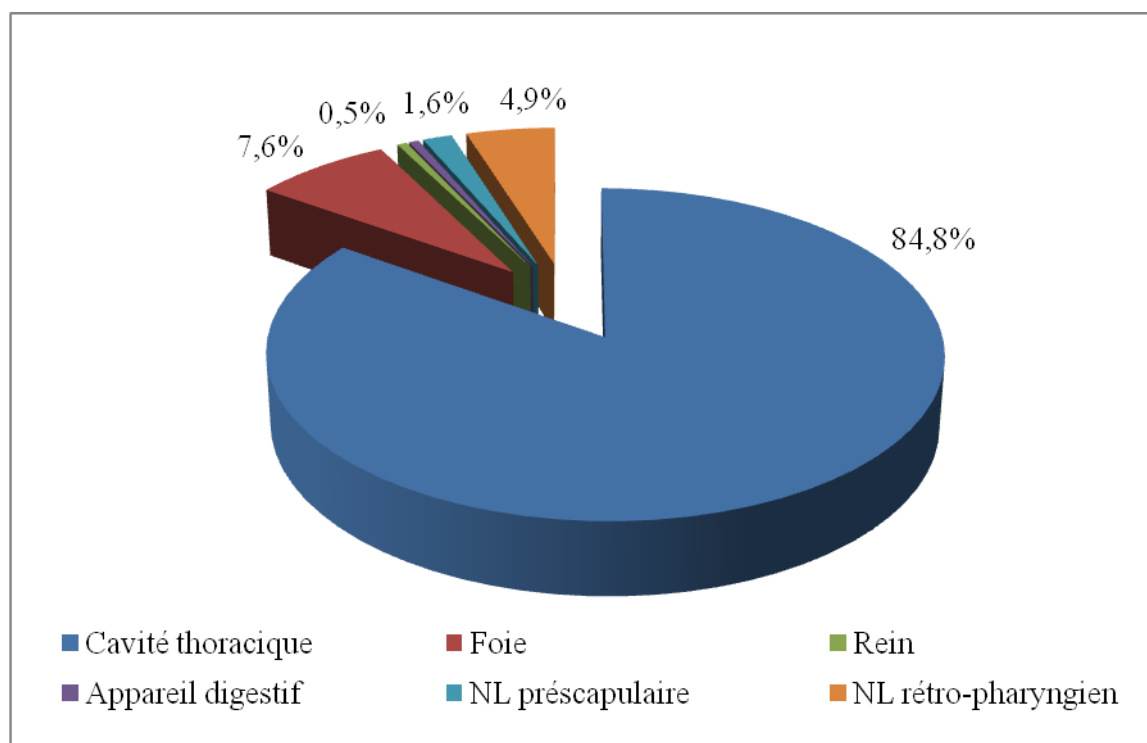


Figure 29 : Prévalence des principales localisations des lésions suspectes de tuberculose bovine dans la carcasse.

Tableau 15 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'organe et les nœuds lymphatique atteints.

Localisation	Positifs (Nb)	Prévalence (%)
NL sternales	1	0,5
NL hépatique	7	3,8
NL inspecteur	4	2,2
NL médiastinal	6	3,3
NL préscapulaire	3	1,6
NL rétro-pharyngien	9	4,9
NL trachéobronchique	132	71,7
La plèvre	4	2,2
Le rein	1	0,5
L'appareil digestif	1	0,5
Parenchyme hépatique	7	3,8
Parenchyme pulmonaire	9	4,9
Total	184	100

Les résultats obtenus (**Tableau 15**) montrent que la plus part des lésions sont localisées dans les nœuds lymphatiques trachéobronchiques 132 (71,7%) IC (0,65-0,78%), suivi par le tissu pulmonaire 9 (4,9%) IC (0,03-0,09%) et les NL rétro-pharyngien 9 (4,9%) IC (0,03-0,09%), le tissu hépatique 7(3,8%) IC (0,02-0,08%) et les NL lymphatiques associés 7(3,8)% IC (0,02-0,08%), le NL médiastinal 6 (3,3%) IC (0,02-0,07%), le LN inspecteur 4 (2,2%) IC (0,01-0,05%), la plèvre 4 (2,2%) IC (0,01-0,05%), le NL préscapulaire 3 (1,6%) IC (0,01-0,05%). Moins fréquemment des lésions sont observées au niveau du NL sternales 1 (0,5%) IC (0,001-0,03%), le tube digestif 1 (0,5%) IC (0,001-0,03%) et le rein 1 (0,5%) IC (0,001-0,03%).

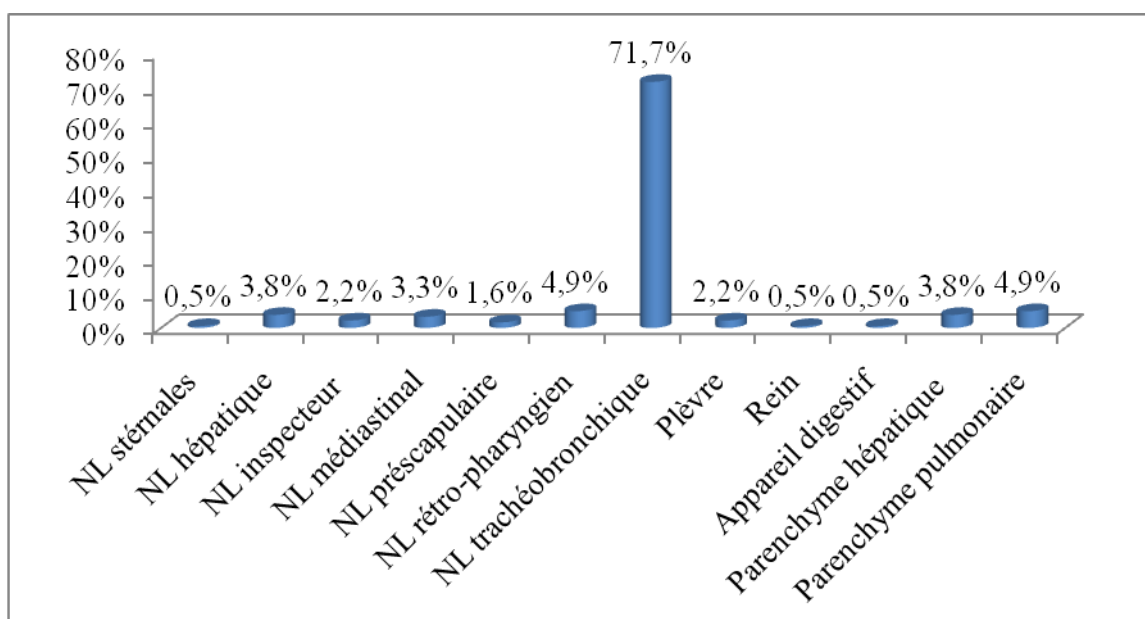


Figure 30 : Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'organe et les nœuds lymphatique atteints.

Quelques exemples de lésions suspectes de tuberculose bovine sont représentés par les figures 30 et 31. Les lésions de la cavité thoracique de la carcasse montrent l'atteinte de la plèvre avec des formations sphériques solides qui peut apparaître sous forme de croissances broussailleuses de couleur gris rougeâtre recouvertes de nodules jaunâtres (Maladie perlière).



Figure 31 : Lésions tuberculeuses dans la cavité thoracique d'un bovin
(Photo personnelle).



Figure 32 : Lésions de tuberculose bovine dans le ganglion lymphatique trachéobronchique
(Photo personnelle).

II.2 Prévalence de la tuberculose bovine selon les facteurs de risques

Nous avons analysé l'effet de 3 principaux facteurs sur la prévalence de la tuberculose bovine au niveau des abattoirs d'étude à savoir le sexe de l'animal, l'âge et la saison.

Tableau 16 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon le sexe de l'animal.

Sexe de l'animal	Positifs (Nb)	Prévalence (%)
Femelle	39	21,2
Mâle	145	78,8
Total	184	100

Les résultats obtenus (**Tableau 16**) montrent que le nombre de carcasses bovines présentant des lésions suspectes de tuberculose est de 145 (78,8%) IC (0,72-0,84%) chez les mâles alors qu'il est de 39 (21,2%) IC (0,16-0,28%) chez les femelles. L'analyse des résultats révèle que les mâles sont plus atteints que les femelles avec une différence significative ($P < 0,0000001$).

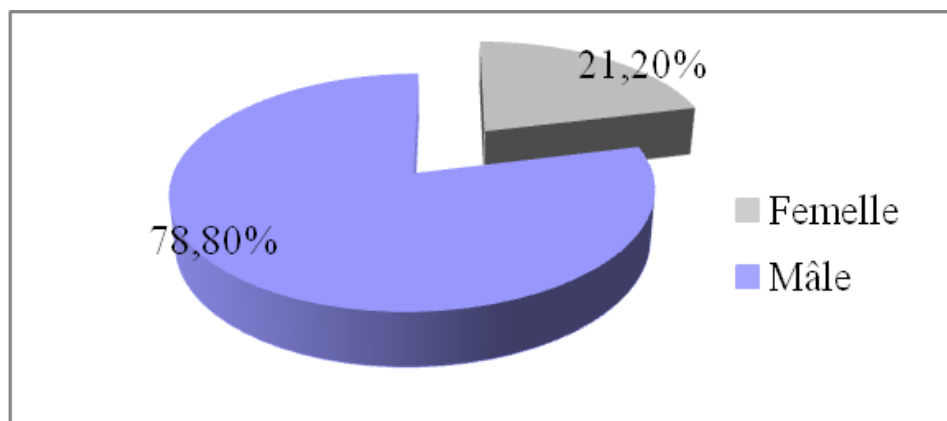


Figure 33 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon le sexe de l'animal.

Tableau 17 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'âge de l'animal

Age de l'animal	Positifs (Nb)	Prévalence (%)
< 2 ans	72	39,1
≥6 ans	33	17,9
[2 et 6 ans [	79	42,9
Total	184	100

Les résultats obtenus (**Tableau 17**) montrent que sur un total de 184 carcasses bovines présentant des lésions suspectes de tuberculose, 72 (39,1%) IC (0,32-0,46%) sont des animaux âgés de < 2 ans, 79 (42,9%) IC (0,36-0,50%) sont des animaux âgés entre [2 et 6 ans] alors que 33 (17,9%) IC (0,13-0,24%) sont des animaux âgés de ≥6 ans. Une différence significative de la prévalence de la maladie ($P < 0,00001$) est observée entre les trois catégories d'âge, cependant, le tau d'atteinte semble être plus élevé chez les animaux jeunes < 2 ans et les animaux adultes [2 et 6 ans [.

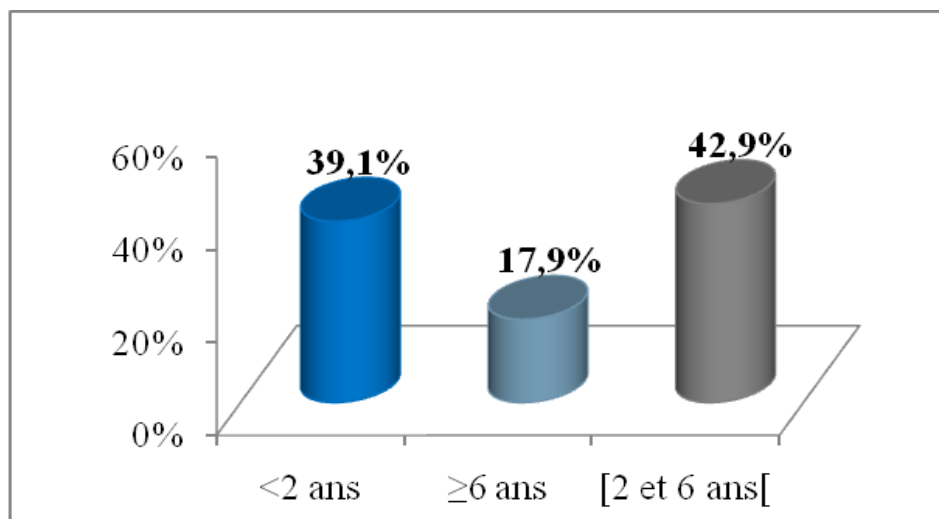


Figure 34 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'âge de l'animal

Tableau 18 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon la saison.

Saison	Positif (Nb)	Prévalence (%)
Avril -Septembre	140	76,09
Octobre-Mars	44	23,91
Total	184	100

Les résultats obtenus (**Tableau 18**) montrent que la tuberculose bovine apparaît dans toutes les saisons. Cependant, la maladie est observée beaucoup plus durant la saison sèche ($p < 0,000$) du mois d'Avril jusqu'au au mois de Septembre 140 (76,09%) IC (0,7-0,82%) par rapport à la saison humide du mois d'Octobre au mois de Mars 44 (23,91%) IC (0,17-0,30%).

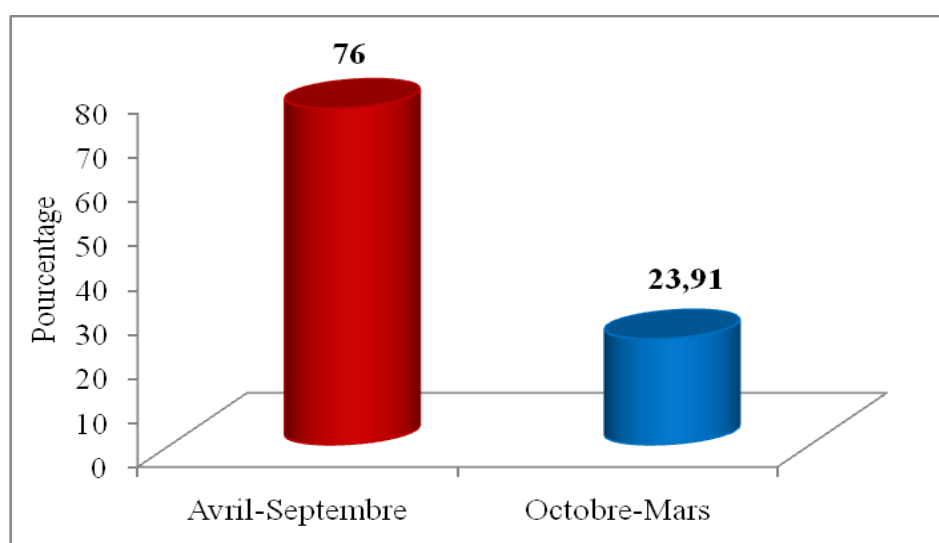


Figure 35 : Distribution des lésions suspectes de tuberculose bovine selon la saison.

II.3 Culture des mycobactéries et examen microscopique

Tableau 19 : Nombre de prélèvements positifs par examen microscopique

Bacilloscopie	Nombre (Nb)	Prévalence (%)
Négative	45	42,9
Positive	60	57,1
Total	105	100

Les résultats obtenus (**Tableau 19**) montrent que sur un total de 105 prélèvements analysés par bacilloscopie, 60 (57,1%) IC (0,48-0,66%) ont montré la présence de bacilles acido-alcolo résistant alors que 45 (42,9%) IC (0,34-0,52%) prélèvements ont montré l'absence de BAAR. Le nombre de bacilloscopie positives est plus important que les négatives avec une différence non significative ($P=0,14$).

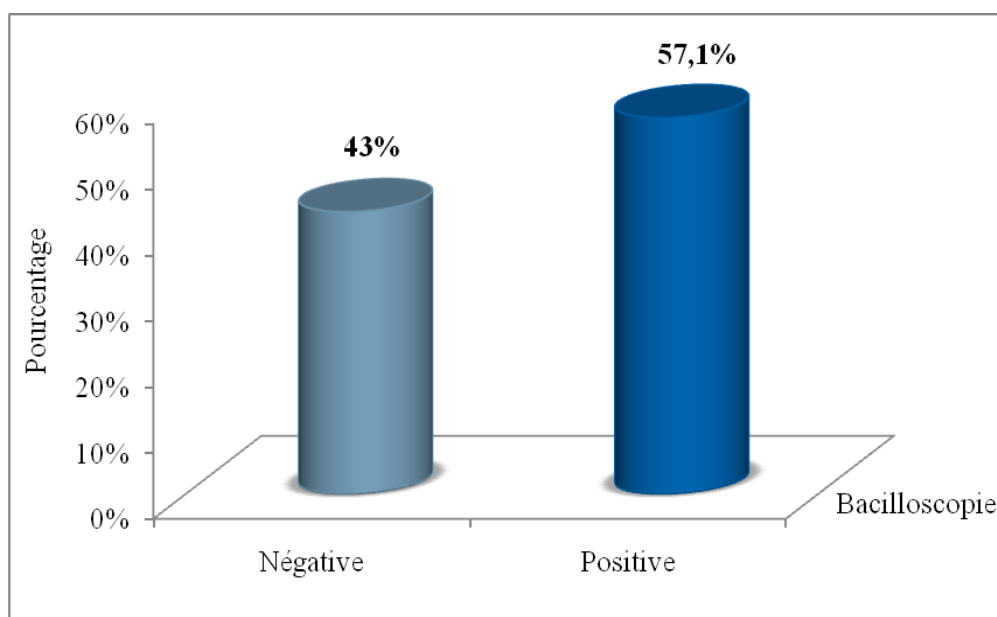


Figure 36 : Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine selon l'examen microscopique.

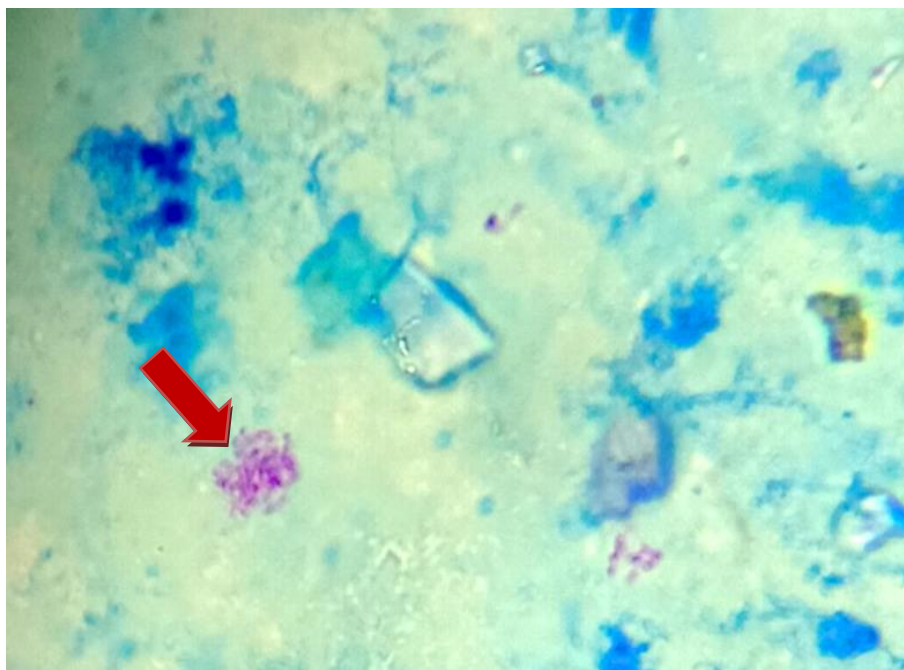


Figure 37 : Microscopie positive montrant des BAAR en forme de coccobacille
(Photo personnelle).

Tableau 20 : Nombre de prélèvements positifs par culture sur milieu de Löwenstein-Jensen.

Culture	Nombre (Nb)	Pourcentage (%)
Contaminée	2	1,9
Négative	43	41,0
Positive	60	57,1
Total	105	100

Les résultats obtenus (**Tableau 20**) montrent que sur un total de 105 prélèvements analysés par culture 60 (57,1%) IC (0,48-0,66%) prélèvements ont montrés une culture positive indiquant la présence de mycobactéries, alors que 43 (41,0%) IC (0,32-0,51%) prélèvements ont montré une culture négative indiquant la présence de mycobactéries. Cependant 2 (1,9%) IC (0,01-0,07%) prélèvement uniquement ont donné une culture contaminée.

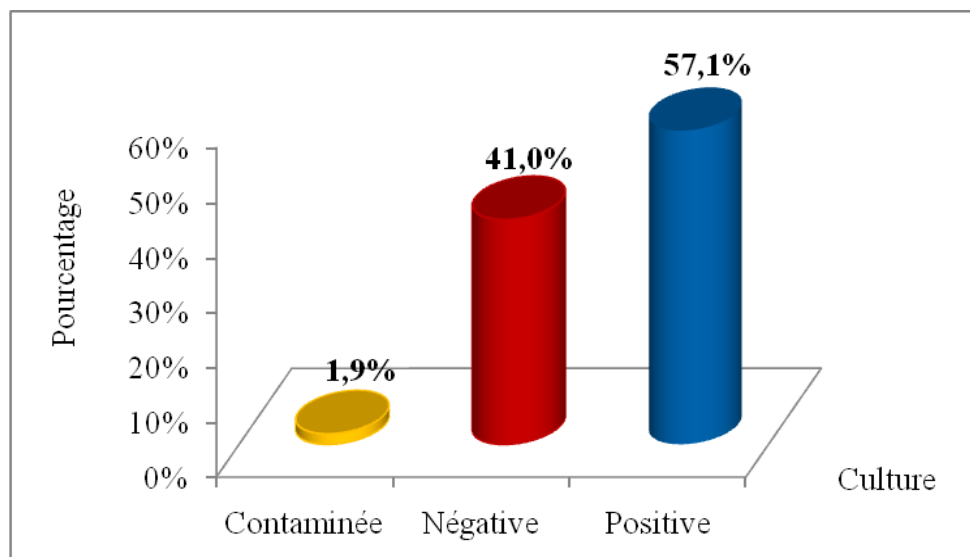


Figure 38 : Prévalence de la tuberculose bovine selon les résultats de la culture sur milieu de Löwenstein-Jensen.

Sur milieu de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. bovis* apparaissent le plus souvent très petites à surface bombée, de couleurs blanchâtres. Cependant, certaines colonies se présentent sous forme plus ou moins large et aplatis de couleurs crème beige.



Figure 39 : Aspect de cultures positives de *M. bovis* sur milieu de Löwenstein-Jensen.
(Photo personnelle)

Tableau 21 : Nombre de prélèvements positifs et négatifs après l'examen microscopique et la culture.

Bacilloscopie	Culture	Nombre (Nb)	Pourcentage (%)
Positive	Négative	18	17,1
Négative	Positive	19	18,1
Négative	Négative	14	13,3
Positive	Positive	54	51,4
Total		105	100

Les résultats du tableau 21 montrent qu'à partir des 105 prélèvements analysés, 18(17,1%) IC (0,01-0,24%) et 19(18,1%) IC (0,10-0,25%) prélèvements ont donné une bacilloscopie positive avec culture négative et une bacilloscopie négative avec culture positive respectivement, 14(13,3%) IC (0,07-0,02%) prélèvements ont donné une bacilloscopie négative avec culture négative. Alors que, 54 prélèvements (51,4%) IC (0,42-0,61%) ont donné une bacilloscopie positive avec culture positive ($P < 0,00001$).

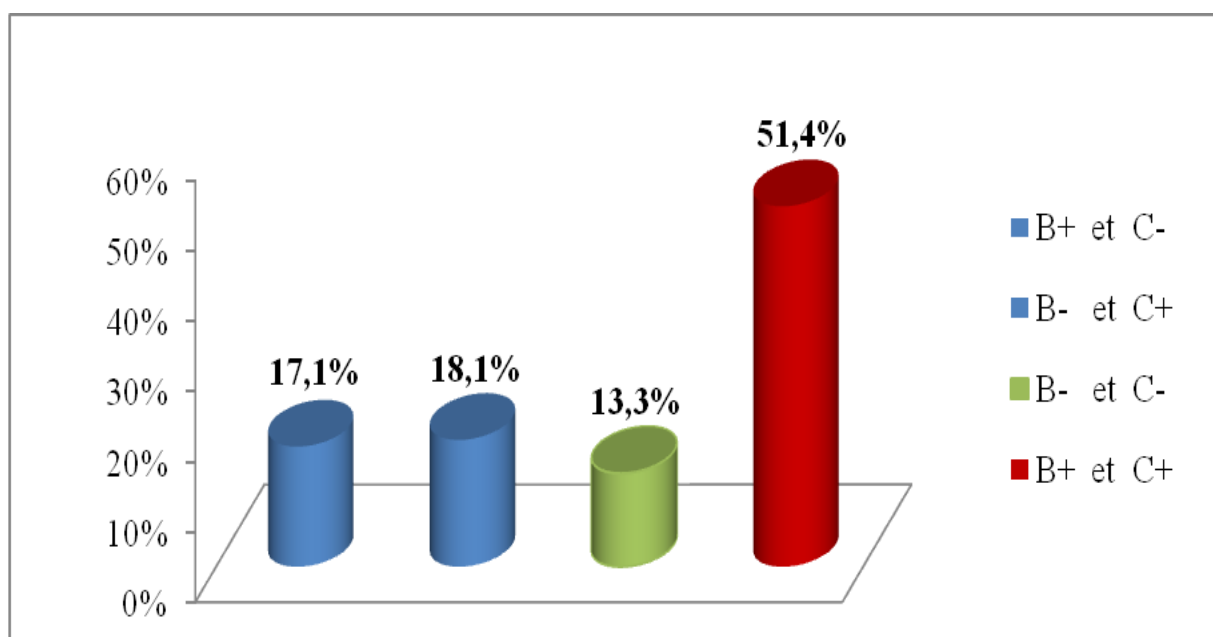


Figure 40 : Nombre de prélèvements positifs et négatifs selon l'examen microscopique (B) et la culture (C).

Tableau 22 : Bacilloscopie positives et négatives à partir des cultures positives.

Microscopie	Culture positive (Nb)	Pourcentage (%)
-	19	31,7
+	41	68,3
Total	60	100

Les résultats obtenus (**Tableau 22**) montrent qu'à partir des 60 prélèvements positifs par cultures, 41 (68,3%) IC (0,56-0,80%) ont donné une bacilloscopie positives, alors que 19 (31,7%) IC (0,2-0,43%) prélèvements ont montré une bacilloscopie négative.

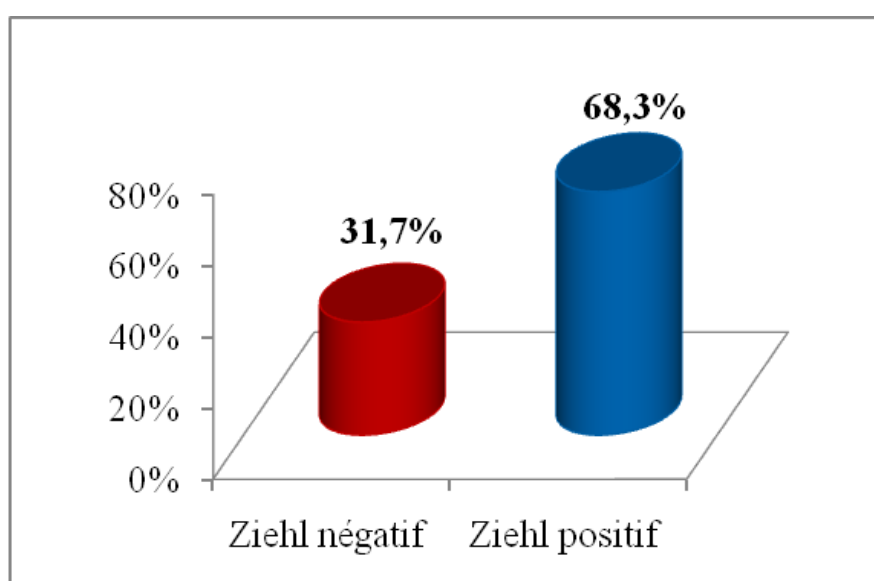


Figure 41: Pourcentage des bacilloscopies positives et négatives à partir des 60 prélèvements positifs par culture.

II.4 Résultat de l'identification moléculaire par PCR-RD9

Lors de la première partie, nous avons mis en évidence par des techniques classiques de laboratoire la présence des mycobactéries dans nos échantillons, ainsi les 60 souches isolées ont été soumises à une extraction d'ADN pour l'identification par PCR-RD9. La PCR-RD9 a montré que les 60 souches isolées dans le présent travail appartenaient au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (**Figure 42**). Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) n'ont pas été isolées dans la présente étude.

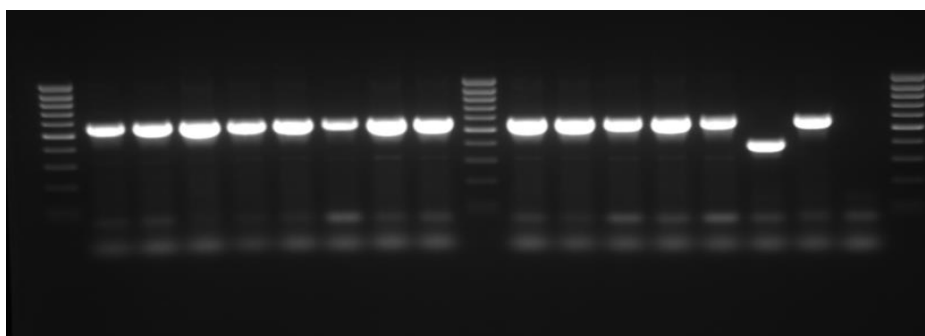


Figure 42 : Résultats de la PCR-RD9 de 13 isolats de mycobactéries (Photo personnelle)

Selon la figure 42 du gel d'électrophorèse, de droite à gauche, nous observons ce qui suit :

- Le puits n°1 : le marqueur de taille (de 80 à 1000pb).
- Le puits n°2 : le témoin négatif (l'eau)
- Le puits n°3 : le témoin positif *M. bovis* (BCG)
- Le puits n°4 : le témoin positif *M. tuberculosis* (H37Rv)
- Le puits n°5 au puit n°9 : les produits PCR de cinq isolat de mycobactéries.
- Le puits n°10 : le marqueur de taille (de 80 à 1000pb).
- Le puits n°11 au puit n°18 : les produits PCR de huit souches de mycobactéries isolées dans la présente étude.
- Le puits n°4 montre la présence d'une bande correspondant aux produits PCR du témoin positif *M. tuberculosis* (H37Rv), cette bande correspond à la présence de la région RD9.
- Le puits n°3 montre la présence d'une bande d'un poids moléculaire différent de celui du témoin positif *M. tuberculosis*. Cette bande représente l'absence de la région RD9.
- Les puits n°5,6,7,8,9 ainsi que les puits n°11,12,13,14,15,16,17,18 montres des profils PCR similaires à celui du puit n°3 correspondants au témoin positif *M. bovis* (BCG).

Ainsi les échantillons n°5,6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,17,18 appartiennent tous au complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

II.5 Résultats du typage moléculaire

La PCR-RD9 est un test moléculaire qui nous permet de savoir uniquement si la souche appartient ou pas au complexe CMT. Pour une identification plus spécifique nous avons procédé à d'autres tests moléculaires notamment le spoligotypage et les MIRU-VNTR.

II.5.1 Résultat du spoligotypage

Toutes les souches CMT positives à la PCR-RD9 (n=60) ont été spoligotypées.

Tableau 23 : Résultats de l'identification de l'espèce des souches isolées par spoligotypage.

Spoligotypage	Nombre (Nb)	Pourcentage (%)
<i>M. bovis</i>	59	98,3
<i>M. caprae</i>	1	1,7
Total	60	100

Parmi les 60 souches analysées par cette technique, 59 (98,3%) appartiennent à l'espèce *M. bovis*, alors que l'une d'entre elles uniquement 1 (1,7%) appartient à l'espèce *M. caprae* (Tableau 23).

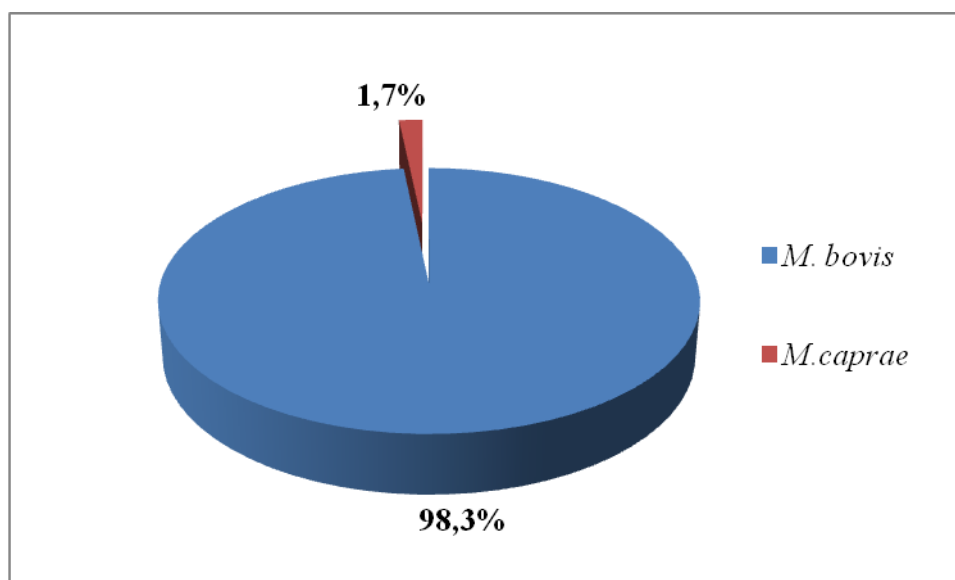


Figure 43 : Prévalence des espèces de mycobactéries isolées responsables des lésions de tuberculose bovine.

Les résultats qui montrent les profils de spoligotypage obtenus sont représentés dans le tableau 24 et illustrés dans la figure 43.

Tableau 24 : Profils de spoligotypes de *M. bovis* (n=59) et *M. caprae* (n=1) et leurs fréquences relatives.

n° SB	Spoligotype		Souches (Nb)	Fréquence (%)	SIT	Famille
	Code binaire	Code octal				
SB0120	11011111011111101111111111111111111100000	676773777777600	20	33,3	482	BOV_1
SB0121	11011111011111101111011111111111111100000	676773677777600	13	21,7	481	BOV_1
SB0134	11000111011111101111111111111111111100000	616773777777600	7	11,7	665	BOV_1
SB2521	11000111011111101110111111111111111100000	616773577777600	5	8,3	Inc	Inc
SB0339	1101111101111110111101111000011111111100000	676773674177600	2	3,3	696	BOV_1
SB0828	110111110111111011111111111111110111100000	676773777773600	2	3,3	1047	BOV_1
SB1542	11000111000111101111111111111111111100000	616173777777600	2	3,3	Orphan	BOV
SB0119	11011111011111100111101111111111111100000	676763677777600	1	1,7	695	BOV
SB0818	110111110111111011111111111111101111100000	676773777767600	1	1,7	1044	BOV_1
SB0822	11001111011111101111111111111111111100000	636773777777600	1	1,7	997	BOV_1
SB0848	11011111011101101111011111111111111100000	676733677777600	1	1,7	1010	BOV_1
SB1452	11011110001111001111011111111111111100000	674363677777600	1	1,7	1595	BOV
SB2520	11000111011111101111111111011111111100000	616773777377600	1	1,7	Inc	Inc
SB2522	110111110111111011111001111111101111100000	676773717757600	1	1,7	Inc	Inc
SB2523	11011111011111101001111111111111111100000	676772377777600	1	1,7	Inc	Inc
SB0835	010000000000000011111111110111011111100000	200003777357600	1	1,7	978	BOV_4 Caprae
Total			60	100		

Nous pouvons analyser les résultats du typage moléculaire par technique de spoligotypage comme suit :

- Selon la figure 43, parmi les 60 souches de mycobactéries caractérisées, 16 profils de spoligotypes différents ont été identifiés.
- Selon la figure 45, toutes les souches de *M. bovis* présentent l'absence des espaceurs 3, 9, 16 et 39 à 43.
- Selon le tableau 24, quatre nouveaux spoligotypes ont été identifiés dans la présente étude, ces spoligotypes ont été soumis à la base de données de spoligotypes de *M. bovis* (<http://www.mbovis.org>). Ces nouveaux spoligotypes ont été nommés respectivement SB2520 (n = 1, 1,7%), SB2521 (n = 5, 8,3%), SB2522 (n = 1, 1,7%) et SB2523 (n = 1, 1,7%).
- Les spoligotypes les plus prédominants sont : le SB0120 (n = 20, 33,3%) et SB0121 (n = 13, 21,7%), appartenant à la famille BOV_1 et ne différant que par un seul espaceurs (n° 21) (**Figure 45**).
- D'autres spoligotypes sont aussi fréquents selon nos résultats à savoir le SB0134 (n = 7, 11,7%) appartenant à la famille BOV_1, le SB0828 (n = 2, 3,3%) et le SB0339 (n = 2, 3,3%) appartenant également à la famille BOV_1 (**Tableau 24**).
- Nous avons identifié deux souches présentant un spoligotype orphelin représenté par le SB1542 (n=2, 3,3%) et appartenant à la famille BOV. Ce spoligotype se caractérise par l'absence des espaceurs n°4, 5,10 et 11 (**Figure 45**).
- Moins fréquemment nous identifions les spoligotypes : SB0119 (n=1, 1,7%) et SB1452 (n=1, 1,7%) appartenant à la famille BOV, le SB0848 (n=1, 1,7%), SB0818 (n=1, 1,7%), SB0822 (n=1, 1,7%) appartenant à la famille BOV_1 (**Figure 44, tableau 24**).
- Sur l'ensemble des 60 souches typés, une seule est représentée par le *M. caprae* SB0835 (n=1, 1,7%) appartenant à la famille BOV_4 Caprae.

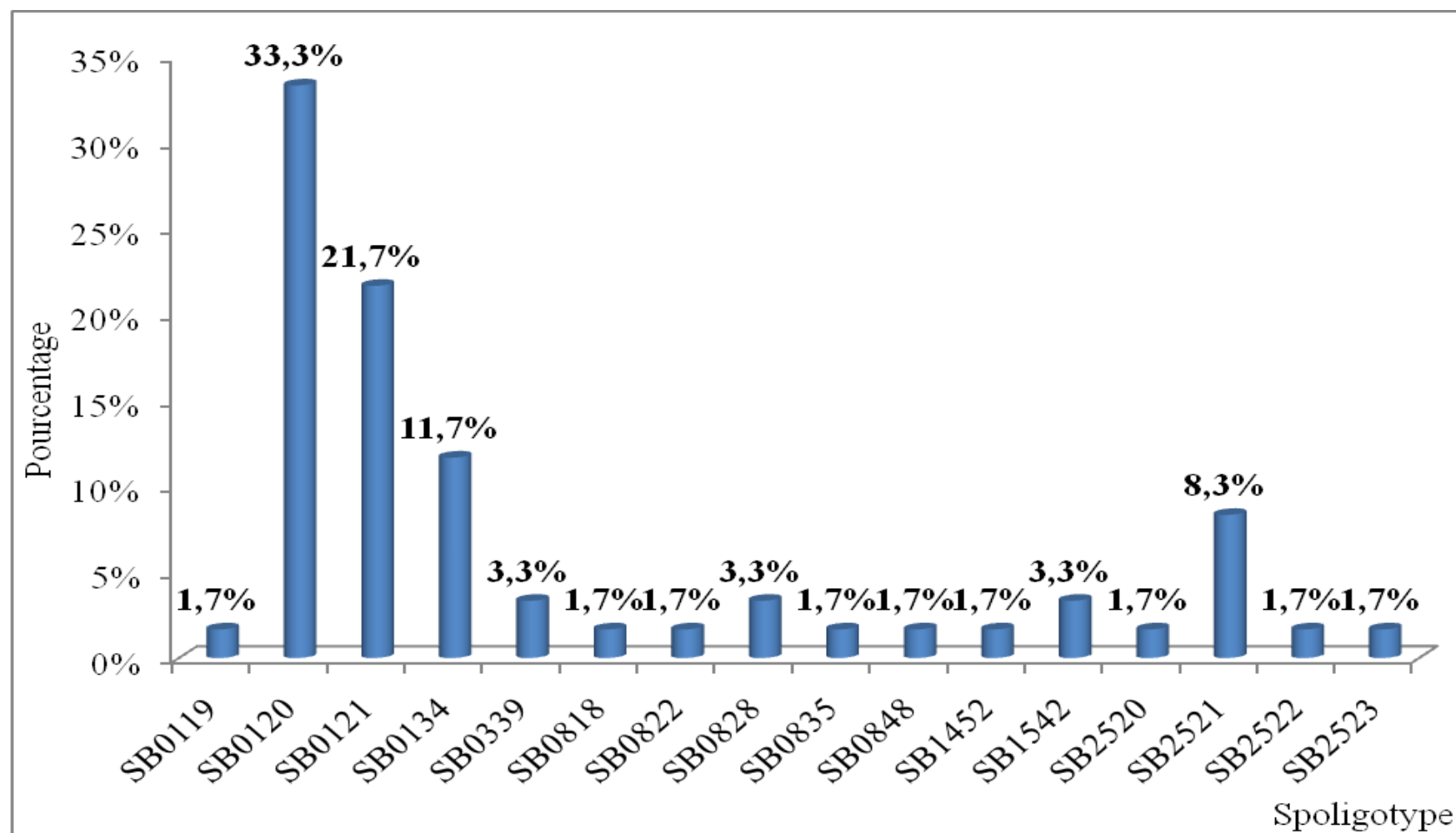


Figure 44 : Spoligotypes des souches de *M. bovis* et *M. caprae* identifiés dans le présent travail.

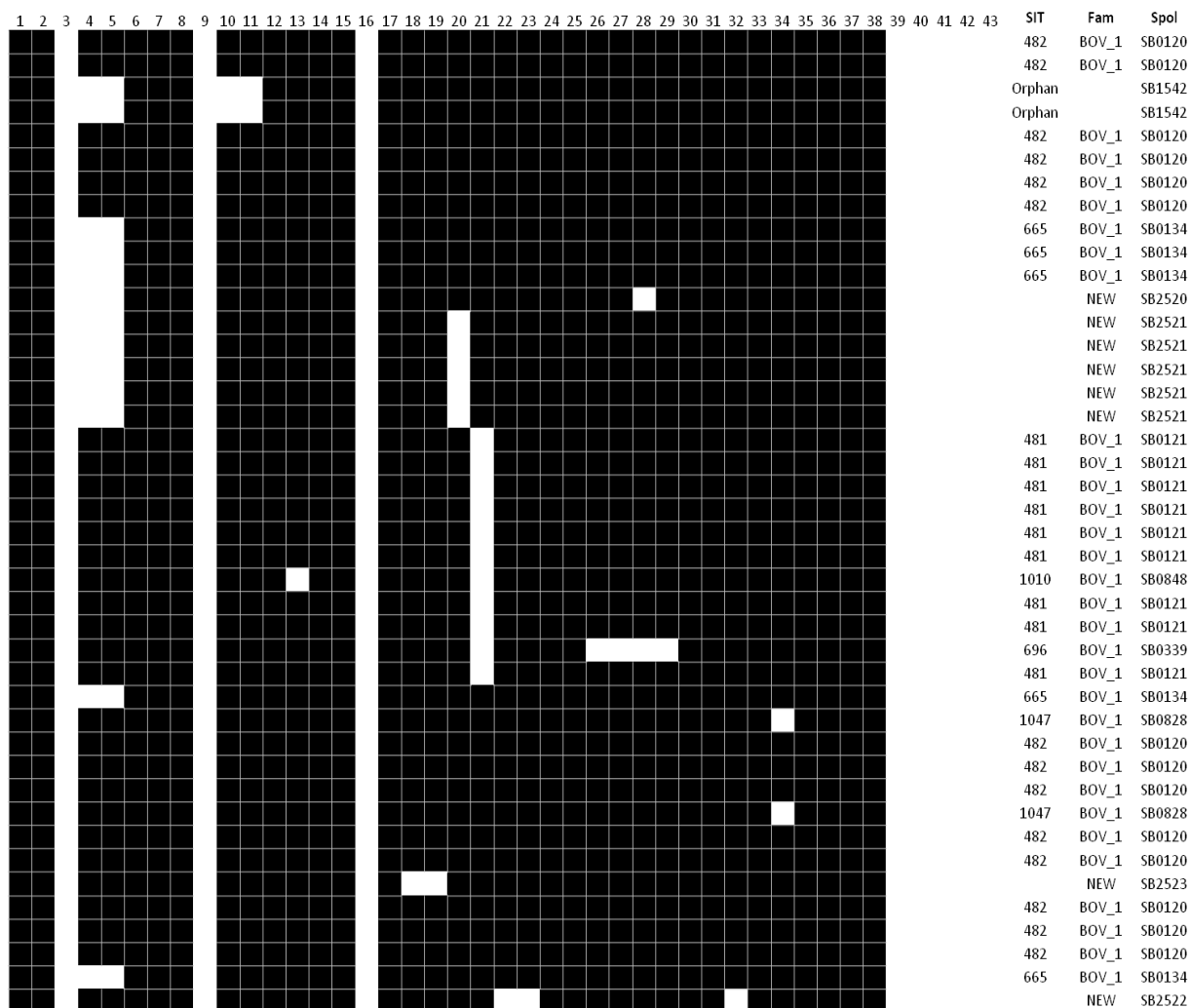


Figure 45 : Profil des spoligotypes des souches de *M. bovis* (n=42) isolés dans le présent travail.

II.5.2 Résultats du typage par 19 loci MIRU-VNTR

Pour une caractérisation moléculaire plus approfondie, nous avons procédé au typage par MIRU-VNTR. Cette technique de typage a été réalisée sur 42 des 60 souches isolées. Les résultats du typage par le loci 2165 (ETR A) sont représentés par la figure 46 après migration des ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.

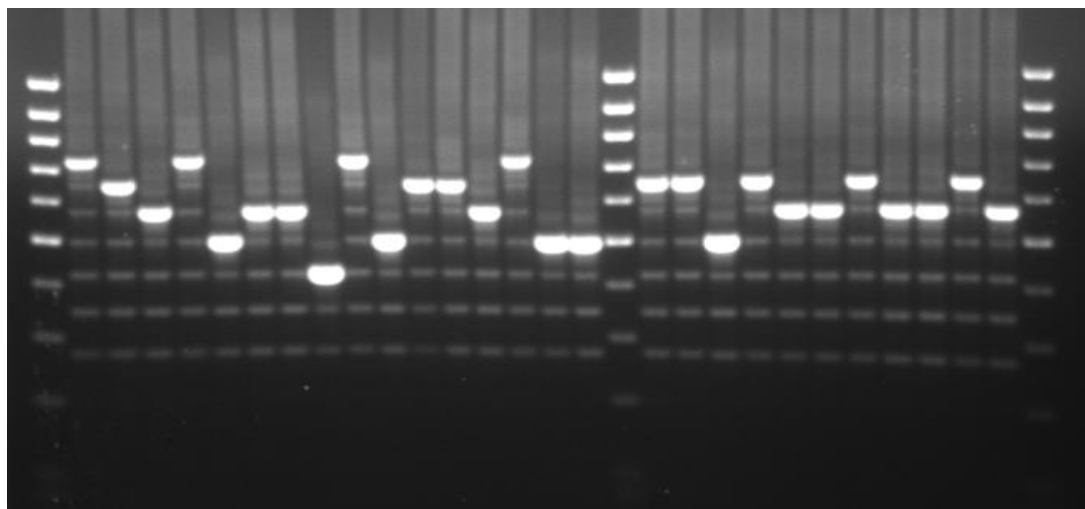


Figure 46: Visualisation des produits PCR du loci 2165 (ETR A)
(Photo personnelle)

☞ Selon la figure 46, de gauche à droite nous observons :

- Le puits n°1 correspond au marqueur de taille (de 100 à 1000pb)
- Les puits n°2 à 17 correspondent aux produits PCR de 16 échantillons
- Le puits n°18 correspond au marqueur de taille (de 100 à 1000pb)
- Les puits n°19 à 29 correspondent aux produits PCR de 11 échantillons.
- Le puits n°30 correspond au marqueur de taille (de 100 à 1000pb).

☞ L'interprétation des résultats du typage par le loci 2165 (ETR A) selon la figure 46 de gauche à droite est comme suite :

- La bande qui apparaît au niveau du puits n°2, montre un poids moléculaire de 720pb, donc le nombre de répétition du loci 2165 (ETR A) est de 7 pour l'échantillon n°1 (**Annexe 8**).
- La bande qui apparaît au niveau du puits n°3, montre un poids moléculaire de 645pb, donc le nombre de répétition du loci 2165 (ETR A) est de 6 pour l'échantillon n°2.
- La bande qui apparaît au niveau du puits n°4, montre un poids moléculaire de 570, donc le nombre de répétition du loci 2165 (ETR A) est de 5 pour l'échantillon n°3.

➤ De manière similaire, nous pouvons décrire la photo du gel suivante correspondant au loci 802 (MIRU40) comme suite :

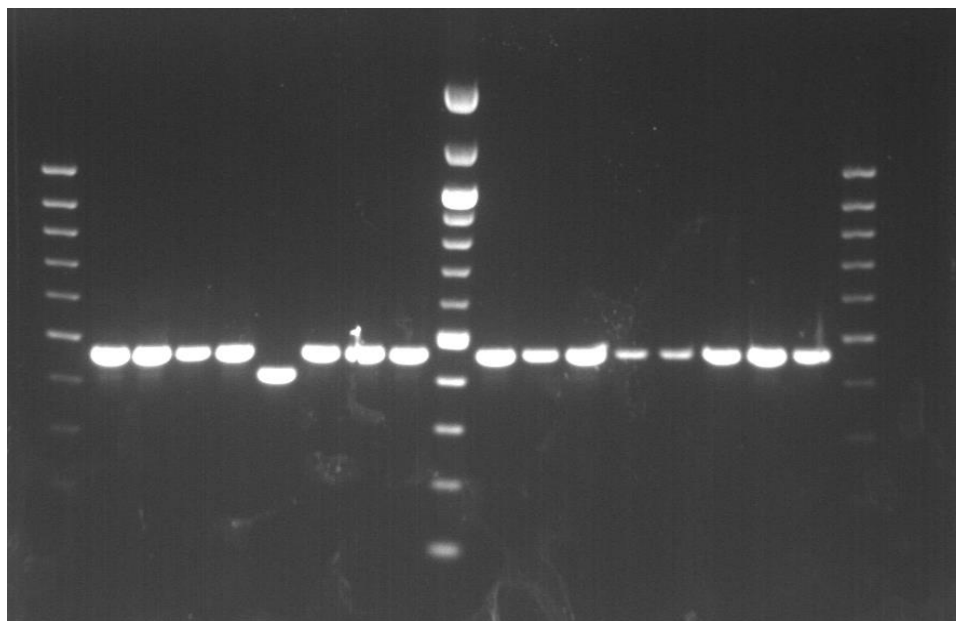


Figure 47 : Visualisation des produits PCR du loci 802 (MIRU40)
(Photo personnelle)

➤ Selon la figure 47, de gauche à droite nous observons :

- Le puits n°1 correspond au marqueur de taille (de 100 à 1000pb).
- Les puits n°2 à 8 et de 10 à 17 correspondent aux produits PCR des échantillons analysés dans le présent travail.

➤ Ainsi l'interprétation du résultat obtenu avec le loci 802 se fait comme suite :

- La bande qui apparaît au niveau des puits n°2, 3, 4 et 5 correspond au poids moléculaire de 462pb, donc le nombre de répétitions du loci 802 est de 2 pour les échantillons n°2, 3, 4 et 5, alors que la bande qui apparaît en position n°6 montre un poids moléculaire de 408pb ce qui correspond à un nombre de répétition de 1 pour le loci 802 pour l'échantillon n°5 (**Annexe 8**).

Nous pouvons conclure à travers les deux photos du gel d'électrophorèse des deux loci 2165 et 802, que le loci 2165 a un fort pouvoir discriminant des souches isolées dans le présent travail alors que le loci 802 présente un très faible pouvoir discriminant des souches isolés dans le présent travail.

Les résultats du pouvoir discriminant des 19 loci analysés sont représentés par les tableaux 25 et 26.

Tableau 25 : Diversité allélique des 10 loci MIRU-VNTR analysés recommandés dans le site web MIRU-VNTR plus.

Locus	VNTR Alias	154 MIRU02	N*(N-1)	577 ETR-C	N*(N-1)	802 MIRU40	N*(N-1)	960 MIRU10	N*(N-1)	1644 MIRU16	N*(N-1)	2059 MIRU20	N*(N-1)	2531 MIRU23	N*(N-1)	2687 MIRU24	N*(N-1)	3007 MIRU27	N*(N-1)	4348 MIRU39	N*(N-1)
Nombre de répétitions	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2	3	6	0	0
	2	41	1640	1	0	41	1640	42	1722	0	0	41	1640	0	0	40	1560	17	272	41	1640
	3	0	0	13	156	0	0	0	0	42	1722	0	0	0	0	0	0	22	462	1	0
	4	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	42	1722	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	25	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somme (S)			1640		758		1640		1722		1722		1640		1722		1562		740		1640
S/N*(N-1)			0,9524		0,4402		0,9524		1		1		0,9524		1		0,9071		0,4297		0,9524
HGDI			0,0476		0,5598		0,0476		0		0		0,0476		0		0,0929		0,5703		0,0476

Tableau 26 : Diversité allélique des 9 loci MIRU-VNTR analysés recommandés pour le typage du *M. bovis*.

Locus	VNTR Alias	580 MIRU04 ETRD	N*(N-1)	2163b QUB11b	N*(N-1)	2165 ETR-A	N*(N-1)	2461 ETR-B	N*(N-1)	2996 MIRU26	N*(N-1)	3192 MIRU31 ETR-E	N*(N-1)	4052 QUB26	N*(N-1)	2163a QUB11a	N*(N-1)	3232 QUB3232	N*(N-1)
Nombre de répétitions	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	2	2	0	0
	2	0	0	16	240	0	0	0	0	0	0	3	6	1	0	0	0	0	0
	3	38	1406	8	56	1	0	1	0	0	0	33	1056	2	2	0	0	2	2
	4	1	0	16	240	7	42	20	380	1	0	6	30	5	20	0	0	1	0
	5	0	0	1	0	11	110	19	342	41	1640	0	0	30	870	1	0	0	0
	6	0	0	0	0	15	210	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	17	272
	7	0	0	1	0	8	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	156
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	56
	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	210	1	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	272	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	20	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Somme(S)			1408		536		418		724		1640		1092		898		504		486
S/ N*(N-1)			0,8177		0,3113		0,2427		0,4204		0,9524		0,6341		0,5215		0,3073		0,2822
HGDI			0,1823		0,6887		0,7573		0,5796		0,0476		0,3659		0,4785		0,6927		0,7178

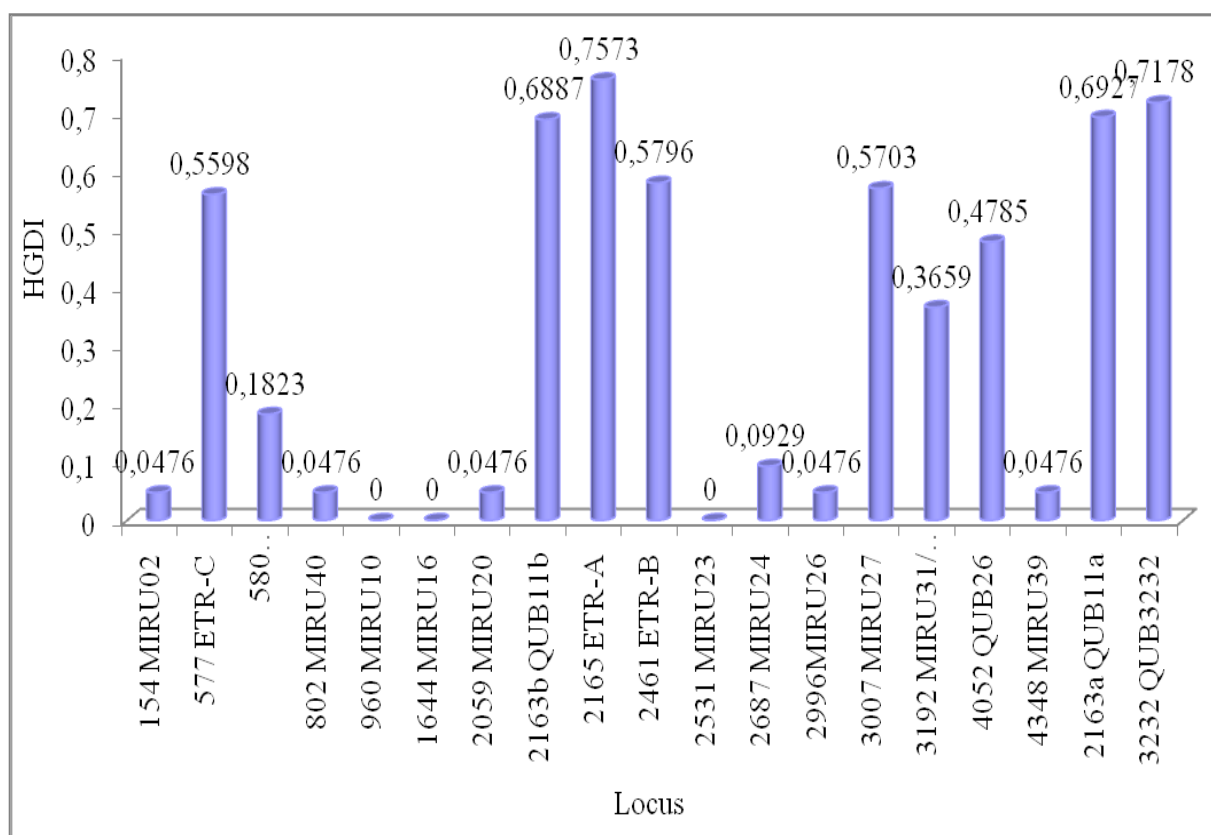


Figure 48 : Diversité allélique (HGDI) de 19 loci MIRU-VNTR obtenu pour les souches de *M. bovis*.

L'analyse des résultats obtenus (**Figure 48**) montre :

- Qu'au total, sept loci VNTR (577, 2163b, 2165, 2461, 3007, 2163a et 3232) ont présenté un pouvoir discriminant élevé (HGDI > 0,50).
- Les deux loci VNTR3192 et VNTR 4052 ont présenté une diversité allélique modérée (HGDI = 0,36 et HGDI = 0,47) respectivement.
- Une faible diversité allélique est observée pour le VNTR580 (HGDI = 0,18).
- Une très faible diversité allélique (HGDI = 0,15) est observée pour six loci VNTR (154, 802, 2059, 2687, 2996 et 4348).
- Aucune diversité allélique (HGDI = 0) n'a été observée avec les loci restants (VNTR960, 1644, 2531).

Le profil du spoligotype et le nombre de répétition de chaque loci VNTR analysé permet d'établir un profil pour chaque souche. Les résultats des profils obtenus pour l'ensemble de 19 loci des 42 souches sont représentés par le tableau 27.

Tableau 27 : Profils VNTR des souches de *M. bovis* obtenu par combinaison du spoligotypage et de 19 loci MIRU-VNTR.

VNTR-loci																							
154 MIRU02	577 ETRC	580 MIRU04	802 MIRU40	960 MIRU10	1644 MIRU16	2059 MIRU20	2163b QUB11b	2165 ETRA	2461 ETRB	2531 MIRU23	2687 MIRU24	2996 MIRU26	3007 MIRU27	3192 MIRU31	4052 QUB26	4348 MIRU39	2163a QUB11a	3232 QUB3232short	Spoligotype	Nombre	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)
2	2	3	2	2	3	2	4	5	5	4	2	5	2	3	1	2	5	6	SB0120	1	2,38	13	39,39
2	3	3	2	2	3	2	4	4	5	4	2	5	2	3	1	3	1	6		1	2,38		
2	3	3	2	2	3	2	4	4	5	4	2	5	2	3	1	2	1	6		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	3	7	5	4	1	5	1	2	3	2	10	6		1	2,38		
2	5	1	2	2	3	2	3	5	5	4	2	5	2	3	5	2	10	7		1	2,38		
2	5	1	2	2	3	2	4	5	5	4	2	5	2	3	5	2	10	7		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	3	4	5	4	2	5	2	3	4	2	10	8		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	4	4	5	4	2	5	2	3	3	2	10	6		1	2,38		
2	5	3	1	2	3	2	4	5	5	4	2	5	2	4	4	2	10	6		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	2	5	5	4	2	5	2	3	5	2	?	6		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	2	5	6	4	1	5	2	3	5	2	10	6	2	4,76			
2	5	3	2	2	3	1	2	5	5	4	2	5	3	3	5	2	9	6	1	2,38			
2	5	3	2	2	3	2	2	7	5	4	2	5	1	2	6	2	10	6	1	2,38			
2	3	3	2	2	3	2	2	6	4	4	2	5	3	3	5	2	10	6	SB0121	1	2,38	5	15,15
2	3	3	2	2	3	2	2	6	3	4	2	5	3	3	5	2	9	7		1	2,38		
2	3	3	2	2	3	2	2	6	4	4	2	5	3	3	5	2	9	8		2	4,76		
2	3	3	2	2	3	2	2	6	4	4	2	5	3	3	5	2	9	7		4	9,52		
2	4	3	2	2	3	2	2	6	4	4	2	5	3	3	5	2	9	7		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	3	6	5	4	2	5	3	3	5	2	10	7	SB0134	1	2,38	5	15,15
2	3	3	2	2	3	2	4	6	4	4	2	5	2	3	4	2	16	6		1	2,38		
2	5	4	2	2	3	2	7	3	5	4	2	4	3	3	5	2	9	6		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	4	6	5	4	2	5	3	3	5	2	10	3		1	2,38		
2	5	3	2	2	3	2	4	6	5	4	2	5	3	3	5	2	9	3	SB1542	2	4,76	1	3,03
2	5	3	2	2	3	2	4	5	4	4	2	5	2	4	5	2	9	7		1	2,38		
2	4	3	2	2	3	2	3	5	4	4	2	5	2	4	4	2	10	6	SB0828	1	2,38	2	6,06
2	5	3	2	2	3	2	3	4	5	4	2	5	2	4	4	2	10	6	SB0828	1	2,38		
2	3	3	2	2	3	2	2	6	4	4	2	5	3	3	5	2	10	7	SB0339	1	2,38	1	3,03
2	3	3	2	2	3	2	2	6	4	4	2	5	3	3	5	2	9	7	SB0848	1	2,38	1	3,03
2	5	3	2	2	3	2	4	7	4	4	2	5	2	3	5	2	11	8	SB2521	1	2,38	2	6,06
2	5	3	2	2	3	2	4	7	4	4	2	5	3	3	5	2	11	8	SB2521	4	9,52		
1	5	3	2	2	3	2	5	4	5	4	2	5	3	3	5	2	10	4	SB2520	1	2,38	1	3,03
2	1	9	2	2	3	2	3	7	4	4	2	5	3	4	2	2	9	9	SB2522	1	2,38	1	3,03
2	5	3	2	2	3	2	3	4	5	4	2	5	1	2	5	2	10	6	SB2523	1	2,38	1	3,03
Total																			42	100	33	100	

Les résultats obtenus (**Tableau 27**) montrent que sur l'ensemble des 42 souches de *M. bovis* analysées par 19 loci, 33 profils VNTR sont identifiés par combinaison des deux techniques de typages. Les profils VNTR sont répartis comme suite : 13 (39,39%) pour le SB0120, 5 (15,15%) pour le SB0121 et 5 (15,15%) pour le SB0134, 2 (6,06%) pour le SB2521, 2 (6,06%) pour le SB0828 et 1 profil (3,03%) pour chacun du reste des spoligotypes (SB0339, SB0848, SB1542, SB2520, SB2522, SB2523).

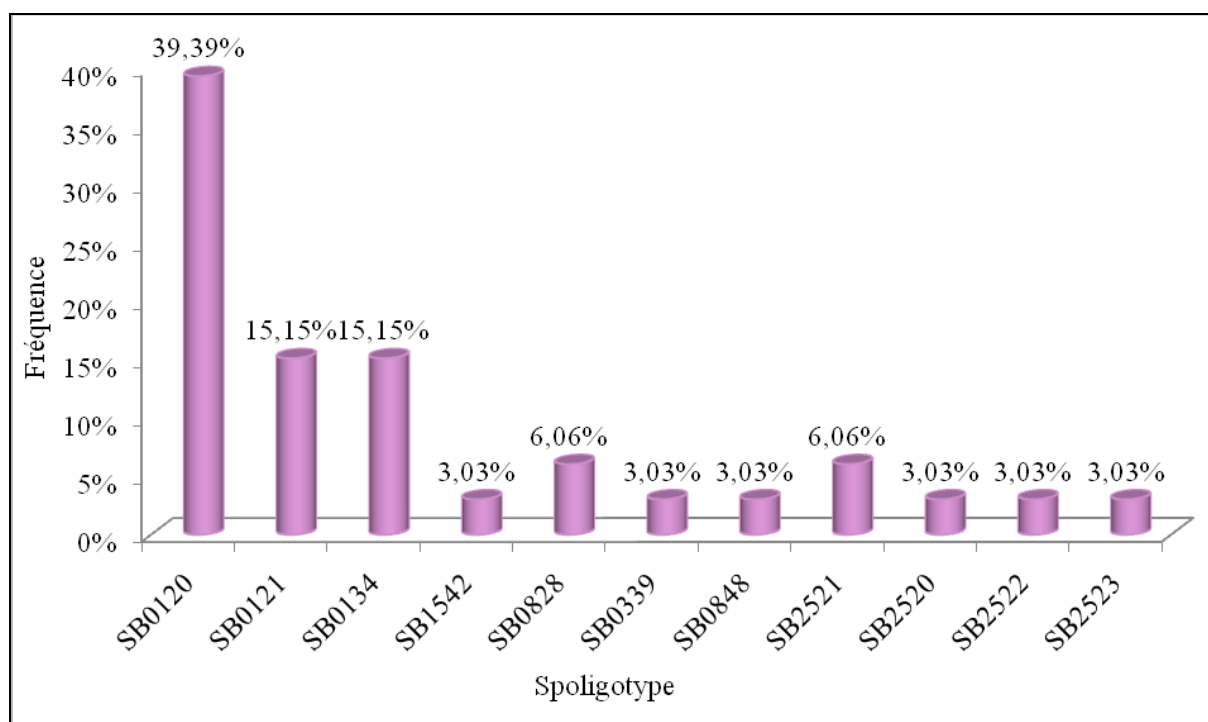


Figure 49 : Fréquence des profils VNTR correspondant à chaque spoligotype.

Les résultats obtenus (**Figure 49**) montrent que le nombre de profil VNTR le plus élevé est observé avec le spoligotype B0120 suivie par le SB0121 et le SB0134.

Un autre objectif du présent travail est d'apprécier le pouvoir discriminant de chacune des deux méthodes de typage moléculaire utilisées seule ou en combinaison, les résultats sont représentés dans le tableau 28.

Tableau 28 : Comparaison du pouvoir discriminant du spoligotypage, du typage par 19 loci MIRU-VNTR et de la combinaison des deux méthodes.

Variable	Spoligotypage	Fréquence (%)	MIRUVNTR	Fréquence (%)	Spoligotypage et MIRU-VNTR	Fréquence (%)
Souches analysées (Nb)	60		42		42	
Profils (No)	16	26,7	32	76,2	33	78,6
Profile individuels (Nb)	9	56,3	27	84,4	28	84,8
Profile regroupés (Nb)	7	43,8	5	15,6	5	15,2
Index Discriminatoire (HGDI)	0,8294		0,9779		0,9826	

Les résultats obtenus (**Tableau 28**) montrent que le pouvoir discriminant du spoligotypage est élevé (HGDI=0,8294). Le pouvoir discriminant du typage par 19 loci MIRU-VNTR est aussi élevé (HGDI = 0,9779). Une meilleure discrimination est observée avec la combinaison des deux techniques de typage (HGDI = 0,9826).

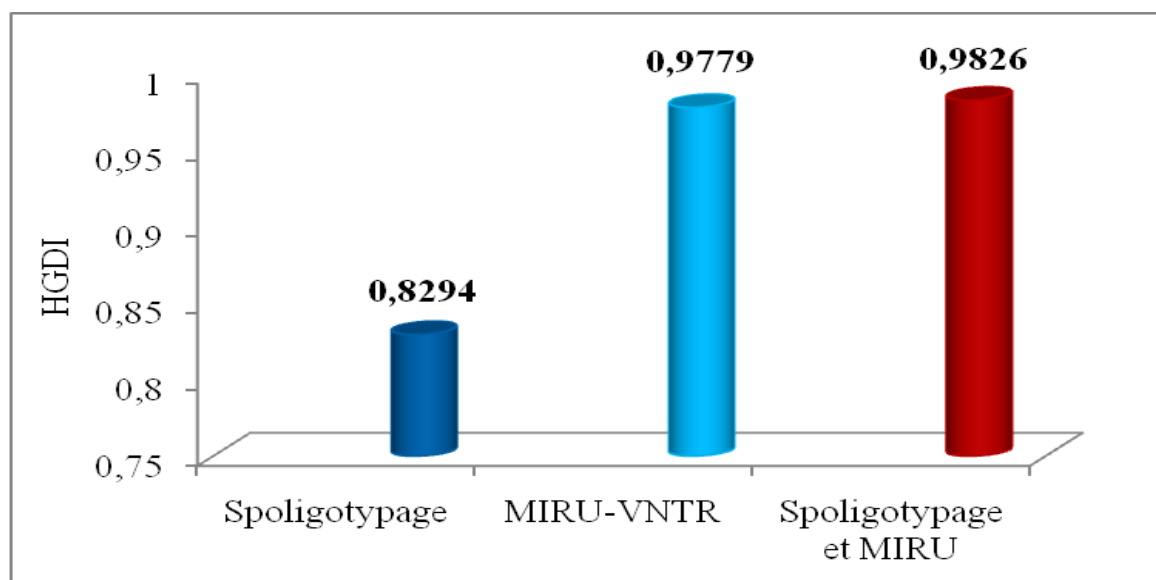


Figure 50 : Indice de discrimination (HGDI) du spoligotypage, du typage par 19 loci MIRU-VNTR et de la combinaison des deux techniques

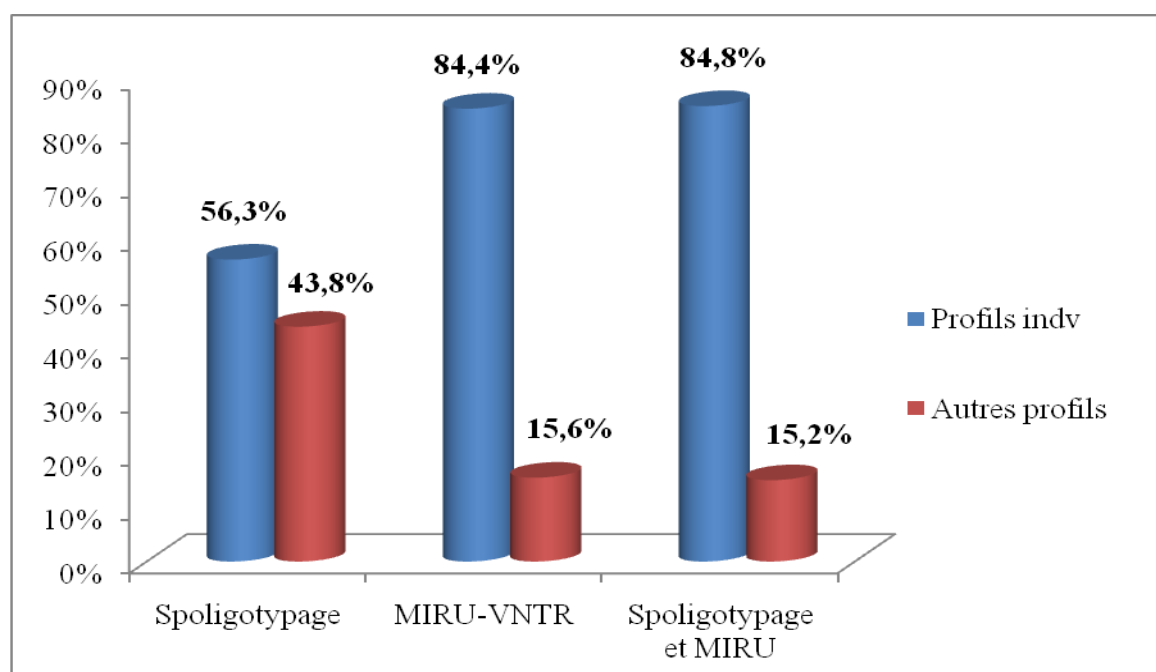


Figure 51 : Fréquences des profils individuels et regroupés selon la technique de typage moléculaire.

Les spoligotypage des 60 souches a révélé au total 16 (26,7%) profils dont 9 (56,3%) sont individuel et 7 (43,8%) sont regroupés. Le typage par 19 loci MIRU-VNTR de 42 souches a révélé 32 (76,2%) profils parmi les quels 27 (84,4%) sont individuel et 5 (15,6%) sont regroupés. La combinaison des deux techniques de typage montre la présence de 33 (78,6%) profils dont 28 (84,8%) sont individuel et 5 (15,2%) sont regroupés.

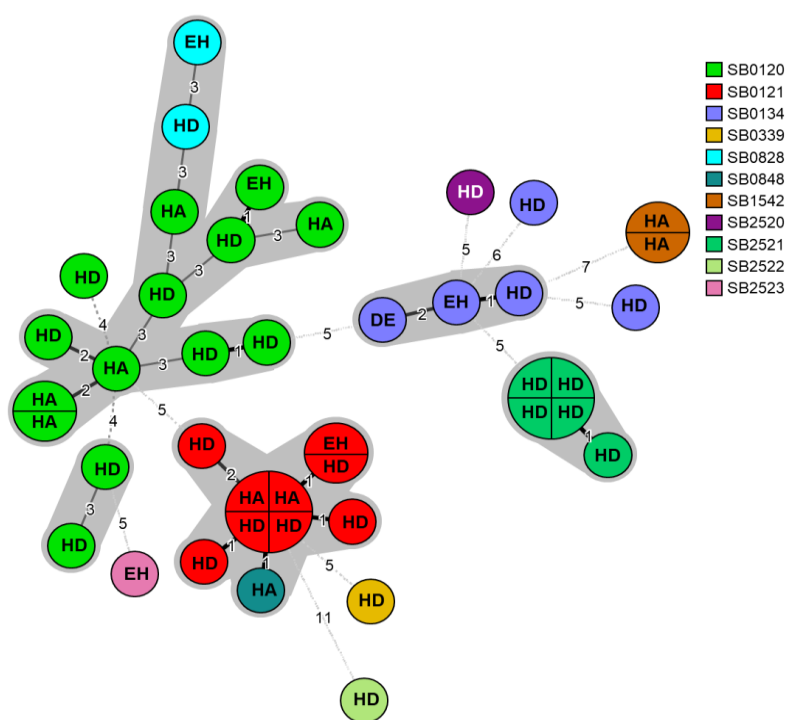


Figure 52: Arbre génétique des souches de *M. bovis* (n=42) obtenu par la combinaison des profils du spoligotypage et des MIRU-VNTR (BioNumerics, version 7.6.2).

- Les résultats de la figure 52 montrent que chaque nœud représente un sous-profil de spoligotype-VNTR unique. Si plus d'une souche présente le même profil, le nœud est séparé. Le nombre d'allèles différents (nombre de répétitions de MIRU-VNTR et absence/présence d'espaces pour le spoligotypage) entre deux nœuds est indiqué par le numéro respectif. La lettre à l'intérieur des nœuds représente l'abattoir d'où proviennent les souches (HD : Hussein Dey, HA : Hadjout, EH : El Harrach, DE : Dellys).
- Nos résultats révèlent la présence de cinq clusters (spoligotype et profil MIRU-VNTR identiques ou présentant une différence de 3 allèles maximum) regroupant 14 souches. Le cluster le plus large comprend quatre souches, cas des spoligotypes SB0121 et SB2521. Le reste des clusters inclue chacun deux souches. Selon la figure 52, le cluster qui constitue le spoligotype SB2521 est représenté par quatre souches provenant de bovins de l'abattoir d'Hussein Dey.

- ↗ Les deux clusters du spoligotype SB0121 constitués de 4 et 2 souches contiennent des souches isolées chez des bovins abattus dans différents abattoirs (Hussein Dey et Hadjout, Hussein Dey et El Harrach).
- ↗ Nos résultats montrent également que les deux spoligotype SB0848 et SB0121 ainsi que le SB0828 et SB0120 sont combinés. Les deux paires ne diffèrent l'une de l'autre que par un seul espaceur (le n° 13 manques dans le SB0848 par rapport au SB0121 et le n° 34 qui manque dans le SB0828 par rapport au SB0120).

Discussion

Discussion

➤ Prévalence des lésions suspectes de tuberculose bovine

Au total, 3848 carcasses bovines ont été inspectées dans quatre abattoirs d'Alger durant la période allant de 2013 à 2017. La majeure partie des animaux abattus proviennent des marchés à bestiaux, ils sont de races croisées et originaires de différentes régions d'Algérie en particulier du Nord.

Dans le présent travail, sur 3848 carcasses bovines inspectées, 184 carcasses (4,78%) ont présenté des lésions suspectes de tuberculose. La prévalence des lésions suspectes de tuberculose enregistrée dans le présent travail est similaire à celle obtenue par **Hamid et al. (2019)** lors d'une étude réalisée au Maroc (4,6%). Elle est plus élevée que celle enregistrée précédemment en Algérie par **Sahraoui et al. (2008)** (3,58%) et **Ayad et al. (2020)** (2,06%) dans d'autres abattoirs d'Alger. La prévalence enregistrée dans le présent travail est plus faible que celle trouvée dans une récente étude réalisée en Algérie par **Damene et al. (2020)** (6,5%). Plusieurs études dans différentes régions d'Afrique ont montré des taux de prévalences élevées en comparaison avec celle obtenue dans le présent travail incluant : **Aylate et al. (2013)**, **Terefe (2014)** et **Pal et al. (2017)** en Éthiopie (8,4%, 6,79%, 5,7% respectivement), au Nigeria (1,90%) et au Mali (11,7%) (**Ejeh et al., 2014 ; Diallo et al., 2016**) respectivement et au Cameroun (12-17%) (**Egbe et al., 2016**). Des prévalences plus élevées sont notées en Tanzanie (19,8%) (**Cleaveland et al., 2007**) et au Ghana (34%) (**Atiadeve et al., 2014**). Le taux d'infection élevé prévalant dans ces pays pourrait indiquer la nature enzootique de la maladie dans les populations de bovins destinés à l'abattage. Le non respect ou l'absence de la notion de barrière aux frontières pourrait expliquer la prévalence élevée de la maladie dans ces pays. En outre, l'infection résiduelle dans les troupeaux pourrait être liée à la transmission indirecte causée par la persistance du micro-organisme dans l'environnement (**Courtenay et al., 2006**), ce qui pourrait conduire à des réinfections isolées dans les troupeaux. Les mycobactéries peuvent persister pendant longtemps sans être observés en raison de leur évolution subclinique chronique, conduisant à une infection persistante dans le bétail. De plus, la présence de caprins infectés dans l'exploitation pourrait contribuer à la recirculation du mycobacterium dans les troupeaux de bovins (**Crawshaw et al., 2008**). D'autre part, l'infection résiduelle dans les troupeaux pourrait être le résultat de la présence de faux négatifs au test de dépistage cutané (**De Mendoza et al., 2006**), ou être la conséquence d'une application incorrecte du test (**Humblet et al., 2009**).

Plusieurs sources de la tuberculose animale sont décrites dans la littérature scientifique (Cowie *et al.*, 2016 ; Katala *et al.*, 2017). Le risque environnemental lié aux mycobactéries, notamment celles du groupe CMT, tient compte de la situation géographique, de l'environnement ainsi que de l'exploitation, telle que la présence de régions boisées propices à héberger des hôtes sauvages porteurs de tuberculose. Il prend aussi compte de la proximité d'autres exploitations. L'apparition de la tuberculose chez les animaux sauvages (Aranaz *et al.*, 2004, Kohl *et al.*, 2018) pourrait constituer une source continue de réinfection du bétail (Schoepf *et al.*, 2012) et pourrait être à l'origine de la persistance de la tuberculose dans le monde, notamment à travers le sanglier, qui représente une nouvelle menace pour le bétail et pour l'agriculture en Algérie. Observé régulièrement à Bejaïa, Tizi-Ouzou, Jijel et Bouira (Ahmim, 2019), le sanglier est très abondant au niveau de la bande frontalière Algéro-Marocaine, il est rencontré dans les différents biotopes surtout dans les endroits humides telles que les oueds (Ouragh, 2003). El Mrini *et al.* (2016) ont décrit des cas de tuberculose à *M. bovis* chez le sanglier d'Eurasie (*Sus scrofa*) au Maroc. Par ailleurs, 84,8% des lésions observés dans nos résultats ont été détectées au niveau de la sphère respiratoire, suggérant une transmission primaire de la tuberculose par la voie aérienne. Le contact nez à nez des bovins avec les animaux sauvages autour des cours d'eau servant de point d'abreuvement faciliterait la transmission de la bactérie.

D'autre part, nous ne pouvons expliquer les résultats obtenus sans évoquer le rôle des mesures de contrôles. La qualité du système de surveillance appliqué en Algérie peut aussi être à l'origine de la persistance de la tuberculose dans les troupeaux et les élevages.

En Espagne comme en Algérie, des programmes d'éradication avec des stratégies de " test-abattage " ont été mis en œuvre depuis des décennies. Mais malgré le renforcement progressif de ces programmes, la maladie n'a pas encore été éliminée. Le système Algérien de surveillance de la tuberculose comprend principalement deux grands volets : le dépistage par le test cutané et la surveillance de la maladie aux abattoirs. Le système espagnol en plus de ces deux composantes fait aussi appel au contrôle des bovins avant leur déplacement. Cependant, il faut noter que la restriction de mouvement des bovins malgré son importance dans la lutte contre la tuberculose, cette pratique impose une charge importante aux agriculteurs, qui s'ajoute au coût direct du programme d'éradication, ce qui peut entraver cette opération durant le programme de surveillance et ainsi la persistance de la circulation de la maladie dans les troupeaux Algériens.

➤ **Distribution des lésions suspectes de tuberculose selon le sexe et l'âge de l'animal**

Selon **Inangolet et al. (2008)**, l'âge, le sexe de l'animal, la taille de l'élevage, le BCS et le système d'élevage, sont des facteurs de risque importants dans la survenue de l'infection tuberculeuse chez les bovins.

Nos résultats montrent une différence statistiquement significative ($P < 0,00001$) dans le taux d'infection entre les mâles et les femelles. Un taux d'infection plus élevée est observé chez les mâles (78,8%) par rapport aux femelles (21,2%). Nos résultats sont différents de ceux de **Nalapa et al. (2017)** qui ont observé que les femelles présentent un risque plus élevé (12,4%) de développer des lésions de tuberculose par rapport aux mâles (8,0%). Encore une fois, nos résultats sont différents de ceux de **Nuru et al. (2015)**, qui ont montré que la majorité des bovins infectés sont des femelles (87,9%).

Nos résultats ont également révélé une différence significative du taux d'infection entre les différentes catégories de bovins (taureaux, vaches et veaux). Une différence du taux d'infection statistiquement significative ($P < 0,00001$) a été enregistré entre les trois catégories d'âge des animaux atteints, à savoir ; les jeunes âgés de moins de 2 ans (39,1%), les adultes âgés entre 2 et 6 ans (42,9%) et les sujets âgés de plus de 6 ans (17,9%). De faibles prévalences sont enregistrées dans les groupes d'âge plus jeunes et des valeurs élevées chez les plus âgés (**Munyeme et al., 2009**). Dans la présente étude, les jeunes animaux (<2 ans) et les adultes [2 et 6 ans] semblent être plus sensibles à l'infection tuberculeuse que les animaux âgés (≥ 6 ans). Nos résultats corroborent ceux de **Mekonnen et al. (2019)**, qui indiquent que l'âge des animaux sensibles à la tuberculose augmente jusqu'à un pic de 5 à 7 ans. A la différence de nos résultats, l'enquête de **Traoré et al. (2004)**, montre que les bovins âgés de plus de 6 ans sont plus touchés par la maladie que les plus jeunes sujets. L'augmentation du taux d'infection observé avec l'âge peut être expliqué par le flux assez régulier de bovins envoyés aux abattoirs à la fin de leur cycle de production, en moyenne à l'âge de 5 ans (**Rossi et al., 2015**). Cela semble être lié à la durée d'exposition au *M. bovis* qui est longue.

La contamination des veaux présentant des lésions de tuberculose, pourrait être due soit à l'ingestion de colostrum contaminé, soit à la transmission pseudo-verticale (contact étroit entre la vache et son veau).

Les veaux et les taureaux sont bien plus destinés à l'abattage que les femelles, en raison de la reproduction ainsi que pour la production de lait ; les femelles sont gardées dans les élevages jusqu'à un âge tardif afin d'exploiter au maximum la production laitière, tandis que les mâles adultes et les veaux sont destinés à être abattus afin de couvrir la consommation

de viande de la population, ce qui explique le nombre plus élevé de sujets mâles présentant des lésions dans nos résultats.

Nos résultats sont différents de ceux rapportés par d'autres auteurs utilisant des méthodes de diagnostic différentes, montrant que le taux d'infection par le bacille tuberculeux enregistré chez les veaux est estimé à 44% de celui des bovins adultes (**Rossi et al., 2019**). En revanche, les conclusions de **Brooks-Pollock et al. (2014)** ont montré que les taux de réaction au test cervical comparatif à la tuberculose augmentent avec l'âge durant les 2 et 3 premières années de vie pour les bovins de boucherie et les bovins laitiers en Grande-Bretagne. En fait, cela est attribué pour les troupeaux associant les vaches et leurs veaux, car les veaux passent la plupart de leur temps avec leur mère avant d'être sevrés et déplacés (**Rossi et al., 2019**).

➤ **Distribution des lésions suspectes de tuberculose selon la localisation sur la carcasse**

Nos résultats ont montré que la plupart des lésions suspectes de tuberculose sont anatomiquement localisées dans la cavité thoracique, particulièrement dans l'appareil respiratoire (84,8%). Ces lésions sont principalement prédominantes au niveau des ganglions lymphatiques trachéobronchiques (71,7%), du tissu hépatique et des ganglions lymphatiques associés (7,6%) ainsi que les nœuds lymphatiques rétropharyngiens (4,9%). Les lésions sont observées moins fréquemment dans les ganglions lymphatiques préscapulaires (1,6%), dans le tube digestif (0,5%) et les reins (0,5%). Nos résultats sont différents de ceux notés par **Uma et al. (2011)**, où le foie représente le premier site d'élection des lésions tuberculeuses suivi par la localisation pulmonaire en seconde position. L'observation de lésions tuberculeuses au niveau du foie selon nos résultats, peut être expliquée par la transmission transplacentaire au fœtus résultant probablement d'une endométrite tuberculeuse chez la vache.

Selon **Serrano et al. (2018)**, la voie de transmission détermine l'emplacement et le spectre des lésions observées dans la tuberculose. D'après **Michel et al. (2010)**, globalement, les lésions tuberculeuses surviennent le plus souvent dans les poumons et les ganglions lymphatiques rétro-pharyngiens, bronchiques, médiastinaux et mésentériques. Dans une enquête menée par **Menzies et Neill (2000)**, 57% des lésions étaient localisées au niveau de la cavité thoracique, alors que 23% uniquement l'étaient au niveau de la tête, ce qui corrobore nos résultats.

Les résultats de **Boukary et al. (2012)** ont montré que 92,77% des lésions macroscopiques sont détectées dans les poumons, ce qui suggère que la voie respiratoire est la porte d'entrée du bacille tuberculeux. L'ingestion de *M. bovis* provenant de pâturages,

d'aliments ou d'eau contaminée provoque généralement des lésions des ganglions lymphatiques mésentériques (**Menzies et Neill, 2000**) et peu ou pas de lésions visibles sur la paroi intestinale (**Neill et al., 2001**), ce qui peut expliquer la présence de ce type de lésion à faible taux dans nos résultats (0,5%).

En effet, dans une étude recherchant la localisation des lésions tuberculeuses chez les bovins (**Corner et al., 1990**) et contrairement à nos résultats l'organe le plus fréquemment affecté était le NL rétro-pharyngien médial (29,4%), suivi du NL médiastinal (28,2%), les NL trachéobronchiques (18,0%), les poumons (8,0%), les NL mésentériques (2,9%), le NL de la parotide (2,4%) et le NL cervical caudal (2,4%).

En résumé, bien que la voie aérogène soit la voie d'infection la plus courante chez les ruminants domestiques ainsi que chez l'homme et que la plupart des cas de tuberculose impliquent les poumons et les NL respiratoires (**O'Reilly et Daborn, 1995**), la voie oropharyngée est apparemment une voie d'entrée fréquente qui est probablement plus pertinente qu'on ne le pense (**Domingo et al., 2014**).

➤ **Distribution des lésions suspectes de tuberculose selon la saison**

Des conditions climatiques favorables à la survie du bacille peuvent permettre de maintenir plus longtemps le bacille infectieux dans l'environnement et ainsi recontaminer une parcelle préalablement décontaminée.

Nos résultats ont montré que la tuberculose est présente dans toutes les saisons, avec une fréquence plus élevée ($p < 0,05$) pendant la saison sèche (76,09%), en particulier en juillet et août par rapport à la saison humide (23,91%). Selon **Ejeh et al. (2013)**, la prévalence des lésions tuberculeuses est de 12,71% et 10,62% à la fin de la saison sèche et au début de la saison des pluies, alors que la prévalence est plus faible à la fin de la saison des pluies (6,98%) et au début de la saison sèche (6,71%). A la différence, **Awah-Ndukum et al. (2010)** au Cameroun et **Ameen et al. (2008)** au Nigéria, ont observé que la détection des lésions tuberculeuses n'est pas influencée par la saison, mais elle est élevée pendant les périodes de stress telles que les périodes d'intersaisons et les pics des saisons. Les résultats de **Boukary et al. (2012)**, de **Raufu et Ameh (2010)** et de **Sa'idu et al. (2017)** du Nigeria ont montré que la fréquence des lésions de tuberculose est plus élevée au début de la saison pluvieuse de juillet et août par rapport à la saison sèche avec une moindre fréquence en hiver (octobre, novembre et décembre). En outre, les données de **Nwata et al. (2011)** ont montré que les variations saisonnières de la maladie ne sont pas significatives, avec une prévalence de 13,2% pendant la

saison des pluies et de 12,5% pendant la saison sèche. D'autre part, **Tuncay et Hatipoğlu (2018)** indiquent que la maladie survient au début du printemps.

La prévalence élevée de la tuberculose en saison sèche (76,09%) durant les mois de juillet -août, notée dans nos résultats, pourrait être attribuée au déstockage massif d'animaux par les éleveurs du bétail au cours de cette saison. Les animaux sont présentés en nombre plus élevé à l'abattage, en particulier durant l'été, ceci serait lié à l'organisation des fêtes et aux célébrations religieuses, où il y a une forte demande en viande durant cette période. En effet, la période d'hiver coïncide avec le retour des animaux de la transhumance.

D'autre part, nous suggérons que les animaux abrités dans de petites granges surpeuplées aient été contaminés durant l'hiver. Pendant la saison hivernale, les animaux sont confinés dans leurs fermes à cause des pluies, ainsi, le contact étroit entre les animaux favorise la transmission de l'infection tuberculeuse. Ce qui fait que les animaux sont infectés pendant la saison froide et expriment la maladie après une longue période d'incubation qui coïncide avec la saison sèche.

➤ **Prévalence de l'infection tuberculeuse selon la bacilloscopie et la culture**

Sur un total de 3848 carcasses bovines examinées aux abattoirs, 184 cas suspects de tuberculose ont été détectés et prélevés. Parmi les 184 prélèvements, 105 ont été analysés par culture et bacilloscopie. À partir des 105 frottis confectionnés, des bacilles acido-acolorés résistants ont été détectés par examen microscopique dans 60 échantillons (57,1%) alors que 45 échantillons (42,9%) étaient négatifs ($p > 0,05$). Le nombre d'échantillons positifs est plus élevé que les négatifs avec une différence non significative ($P = 0,14$). De manière similaire, les travaux de **Aljameel et al. (2014)** ont montré que 124 (76,1%) échantillons ont donné une bacilloscopie positive alors que 39 (23,9%) étaient négatifs aux BAAR. Nos résultats confirment que la technique de Ziehl-Neelsen offre une bonne sensibilité pour la détection des BAAR dans nos échantillons.

Trois aspects de bacilles ont été distingués dans le présent travail. Souvent, les bacilles étaient individuellement séparés ou bien groupés en deux ou trois longs filaments, faisant rappeler le *M. tuberculosis*. D'autres aspects sous forme de petits bacilles courts et trapus ont été observés, plus rarement sous forme de coccobacille. Les bacilles sont généralement colorés en rose sur fond bleu.

Néanmoins, les méthodes conventionnelles de détection de la tuberculose utilisant l'examen microscopique sont non spécifiques en raison d'une possible confusion avec d'autres

genres pouvant présenter le même aspect que les mycobactéries à savoir ; *Gordonia*, *Norcadia*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella* (Talip et al., 2013).

Concernant la culture des mycobactéries, sur un total de 105 prélèvements analysés par culture sur milieu de Löwenstein-Jensen, 60 (57,1%) prélèvements ont montré une culture positive indiquant la présence de mycobactéries et présentant un aspect typique du *M. bovis*, alors que 43(41%) prélèvements ont montré une culture négative. Cependant 2 (1,9%) prélèvements uniquement ont donné une culture contaminée. La culture au laboratoire reste la méthode la plus affirmative pour l'identification des mycobactéries par rapport à l'examen microscopique et anatomopathologique.

➤ Résultats de l'identification et du typage moléculaire des souches de *M. bovis*

✦ Identification par PCR-RD9

Lors de la première partie, nous avons mis en évidence par des techniques classiques la présence de mycobactéries dans nos échantillons. Ainsi les 60 échantillons qui se sont révélés positifs ont été soumis à une extraction d'ADN pour l'identification et la confirmation des isolats par PCR-RD9. La PCR-RD9 a montré que les 60 isolats testés dans le présent travail appartenaient tous au complexe *M. tuberculosis* (CMT). L'étude de Courcoul et al. (2015) montre que la PCR est plus sensible et spécifique que la bactériologie. Cela fait de la PCR un outil utile qui doit potentiellement devenir un test de diagnostic officiel en association avec les tests classiques de diagnostic de laboratoire de la tuberculose en Algérie. Bien que la tuberculose se révèle présente dans la plupart des pays d'Afrique, la véritable étendue de la maladie n'a pas été réellement évaluée et les enquêtes par génotypage sont souvent limitées suite aux contraintes économiques. Comme pour les autres techniques de typage moléculaire, le spoligotypage permet de classer les isolats en souches distinctes et permet de mettre en évidence la diversité génétique du *M. bovis*. Les 60 isolats obtenus dans le présent travail ont été soumis à l'analyse par typage moléculaire à savoir, le spoligotypage.

✦ Spoligotypage

Toutes les souches CMT positives à la PCR-RD9 (n=60) ont été spoligotypées. Parmi les 60 souches analysées par cette technique, 59 (98,3%) appartiennent à l'espèce *M. bovis*, alors qu'une d'entre elles uniquement 1 (1,7%) appartient à l'espèce *M. caprae*. Sur l'ensemble des 60 souches analysées, 16 spoligotypes différents ont été identifiés, dont quatre nouveaux spoligotypes ont été décelés. Ces nouveaux spoligotypes ont été soumis à la base de données de spoligotypage de *M. bovis* (<http://www.mbovis.org>), et ont été nommés respectivement : SB2520 (1,7%), SB2521 (8,3%), SB2522 (1,7%) et SB2523 (1,7%).

Nos résultats montrent que les spoligotypes les plus répandus sont le SB0120 (33,3%) et le SB0121 (21,7%), ne différant que par un seul spacer (n°21) et appartenant à la famille BOV_1, suivis par le SB0134 (11,7%). Sont classés par la suite parmi les plus fréquents dans nos résultats les spoligotypes SB2521 (8,3%) et SB0828 (3,3%). Il convient de mentionner que les spoligotypes les plus répandus, SB0120, SB0121 et SB0134, issus d'une étude menée 12 ans plus tôt en Algérie (**Sahraoui et al., 2009**) sont toujours présents et prédominants.

L'analyse des résultats montre que 3 spoligotypes identifiés dans la présente étude, à savoir le SB0119 (1,7%), le SB0848 (1,7%) et le SB1542 (3,3%) n'ont pas été signalés en Algérie dans les études antérieures (**Sahraoui et al., 2009 ; Damene et al., 2020**). La comparaison de nos résultats avec ceux de **Damene et al. (2020)** en Algérie, montre qu'en plus des 3 spoligotypes SB0120, SB0121 et SB0134, 4 autres spoligotypes présents dans nos résultats ont été également identifiés précédemment, ceux sont le SB0339 (3,3%), le SB0828 (3,3%), le SB0835 (1,7%) et le SB0818 (1,7%). Egalement, 3 autres spoligotypes ont été signalés précédemment en Algérie par **Sahraoui et al. (2009)** à savoir : le SB0828 qui a été détecté dans un seul échantillon au Brésil (**Alzamora-Filho et al., 2014**), le SB0822 retrouvé en Colombie (**Jojoa-Jojoa et al., 2016**) et le SB1452 qui selon la base de données "The Mycobacterium bovis Spoligotype Database", n'est observé jusqu'à présent qu'en Algérie.

Des données remarquables en Algérie montrent que deux nouveaux spoligotypes identifiés dans la présente étude ont également été retrouvés chez les bovins (SB2520) mais aussi chez l'homme (SB2521) (**Damene et al., 2020**). D'autre part, en Tunisie, les résultats de **Siala et al. (2019)**, ont montré l'importance zoonotique des spoligotypes SB0120, SB0121 et SB0134 isolées de bovins et chez l'homme ; ceci suggère le rôle important occupé par les spoligotypes SB0120, SB0121, SB0134 et SB2521, dans la transmission zoonotique du *M. bovis*.

Sur l'ensemble des 60 souches typées, une seule uniquement appartient au *M. caprae*, elle est représentée par le spoligotype SB0835 (1,7%). Deux souches présentent un spoligotype orphelin le SB1542 (3,3%). Selon la base de données "The Mycobacterium bovis Spoligotype Database", le SB1542 est identifié en Italie et le *M. caprae* SB0835 en France.

Le *M. caprae* a été signalé principalement en Europe continentale dans la région des Alpes (**Prodinger et al., 2005**) tel que l'Autriche et la Bavière isolées à partir de bovins et de cerf (**Büttner et al., 2015**). *M. caprae* a été isolé en Pologne à partir de bovins et de bison (**Krajewska-Wędzina et al., 2017**), mais aussi en Espagne (**Rodríguez et al., 2011**). Peu de données existent sur la circulation du *M. caprae* en Afrique. Une souche algérienne unique de *M. caprae* été identifiée auparavant, elle appartient au spoligotype SB1451 (**Sahraoui et al.,**

2009). De façon similaire, 3 souches uniquement de *M. caprae* appartenant au spoligotype SB835 et SB1451 sont identifiées en Algérie dans l'étude de **Damene et al. (2020)**. Ceci est cohérent avec nos résultats, ce qui souligne la rareté de *M. caprae* dans notre pays. Par ailleurs, la présence de *M. caprae* dans le cheptel bovin serait liée à la cohabitation avec l'élevage caprin. Le *M. caprae* semble survenir moins fréquemment que le *M. bovis* en Algérie, ceci est probablement lié à la résistance naturelle des bovins à cette espèce.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus chez nos voisins du Maroc, de la Tunisie mais aussi en France (**Djemal et al., 2017 ; Yahyaoui-Azami et al., 2017**), nous identifions la présence des 3 spoligotypes majeurs communs : le SB0120, SB0121 et le SB0134. Il est intéressant de constater qu'en plus de ces 3 spoligotypes 2 autres ont été identifiés dans la présente étude et aussi au Maroc à savoir le SB0339 et la SB0119. Ces deux spoligotypes sont fréquents dans la péninsule ibérique, de cela le SB0339 étant fréquemment signalé en Espagne (**de la Fuente et al., 2015**) et le SB0119 au Portugal (**Matos et al., 2010a**). Par contre, nous constatons que le second spoligotype le plus fréquent au Maroc le type SB0265 n'a pas été retrouvé dans la présente étude ainsi que celles réalisées précédemment en Algérie, bien qu'une analyse *in silico* des données du séquençage du génome entier (WGS) de quatre isolats humains algériens de *M. bovis* (**Tazerart et al., 2021**) ait pu attribuer deux des souches isolées au type SB0265, ce qui implique que le spoligotype SB0265 est bel et bien présent chez les bovins en Algérie.

Les spoligotypes SB0121 et SB0120 sont les types les plus fréquents qui circulent pratiquement dans le monde entier. Ce sont les types les plus communs qui circulent dans plusieurs continents, notamment en Europe, en Afrique et en Amérique (**Ghavidel et al., 2018**), avec une plus grande fréquence en France, en Italie, en Belgique, en Espagne et au Portugal (**Haddad et al., 2004**). Le SB0134 est également fréquent dans certains pays d'Afrique tels la Tunisie et le Maroc (**Lamine-Khemiri et al., 2013**), le Mali (**Müller et al., 2008**) et l'Éthiopie (**Biffa et al., 2010 ; Mekonnen et al., 2020**). Le nouveau spoligotype SB2520 identifié dans la présente étude a été également récemment retrouvé en Éthiopie (**Mekonnen et al., 2020**). Il est fortement évident que la distribution du *M. bovis* dans certains pays de l'Afrique résulte du commerce et des mouvements transhumants du bétail. Quand au spoligotype SB0818, celui-ci a été signalé en Italie (**Boniotti et al., 2009**) et en France (**Boschioli et al., 2015 ; Hauer et al., 2015**). Le SB0848 a été signalé en Tunisie (**Lamine-Khemiri et al., 2013**) ainsi qu'au Portugal (**Matos et al., 2010b**).

A travers notre analyse, il en découle que la composition des spoligotypes en Afrique du Nord reste dominée par les spoligotypes SB120, SB121 et SB0134. Ces 3 spoligotypes

sont les plus fréquemment retrouvés en Algérie et également les 3 types majeurs observés en France depuis 1978 (**Hauer et al., 2015**). Ainsi, nous suggérons que les souches de *M. bovis* circulant en Algérie se sont développées par l'évolution d'un ancêtre commun de *M. bovis* probablement introduit depuis des décennies depuis l'Europe. La France représente le pays à partir duquel la majorité des bovins en Algérie sont importés. Cependant, selon l'OIE-WAHIS interface, la France est déclarée officiellement indemne de tuberculose (OTF) par l'Union Européenne. En revanche, malgré ce statut d'indemne, la tuberculose existe toujours en France et des foyers isolés sont notifiés de manière répétée dans les élevages ainsi que dans la faune sauvage dans certaines régions du pays. En outre, l'importation récente de bovins vivants d'Europe en Algérie ayant été fréquente, les similarités existantes entre les spoligotypes pourraient bien refléter l'introduction de *M. bovis* de France en Algérie.

A travers nos résultats, nous constatons que tous les isolats de *M. bovis* se caractérisent par l'absence des spacers 3, 9, 16 et 39 jusqu'au 43, ceci constitue le profil de signature de la souche vaccinale BCG du *M. bovis* décrite par **Haddad et al. (2004)** qui ont montré l'existence de deux groupes de mycobactéries du complexe tuberculosis : le premier est celui de type BCG-like représenté par le SB0121 et le second par l'ancêtre BCG-like représenté par le SB0120. Ainsi, tous les isolats de *M. bovis* identifiés dans le présent travail appartiennent au groupe BCG. Par ailleurs, le génotypage de ces bactéries peut également permettre de reconstruire la phylogéographie et l'histoire de l'évolution de ces pathogènes (**Loiseau et al., 2020**). Le spoligotypage combiné à d'autres marqueurs génomiques tels que les délétions (**Smith, 2012 ; Loiseau et al., 2020**) et les SNP (single-nucleotide polymorphisms), ont été utilisés pour construire la phylogéographie des souches de *M. bovis*. C'est alors en 2012 que **Smith** décrit la phylogéographie des complexes clonaux de *M. bovis* répartis en 4 lignages nommés : African 1, African 2, European 1 et European 2.

Le complexe clonale « African 1 » (Af1, caractérisé par l'absence du spacer 30) se localise géographiquement en Afrique Centrale de l'Ouest (Mali, Cameroun, Tchad et Nigéria) (**Muller et al., 2009**). Le complexe clonal « African 2 » (Af2, les spacers manquants 3 à 7) localisé géographiquement en Afrique de l'Est (Ouganda, Burundi, Tanzanie et Éthiopie) (**Berg et al., 2011**). Le cluster « European 1 » (Eu1, spacer manquant 11) se retrouve principalement dans les îles britanniques, en Nouvelle-Zélande, en Australie, en Afrique du Sud et en Corée (**Smith et al., 2011**). Le complexe « European 2 » (Eu2, absence du spacer 21) est retrouvé dans la péninsule ibérique et l'Europe de l'Ouest (**Rodriguez-Campos et al., 2014 ; Smith, 2012**). Quand au continent africain, l'ancêtre BCG-like est retrouvé de façon prédominante en Algérie, en Zambie (**Malama et al., 2014**) et au

Mozambique (**Machado et al., 2018**). Il a été observé que les souches du complexe clonal Af1, Af2, and Eu1 n'étaient pas présentes à haute fréquence chez les bovins en dehors des régions géographiques respectifs cités précédemment (**Smith, 2012**).

En plus de ces quatre lignages phylogénétiques "classiques", huit nouvelles lignées clonales ont récemment été définies sur la base des données du séquençage de génome complet (WGS) de plus de 3300 isolats de *M. bovis* et des spoligotypes ont été affiliés à certaines lignes phylogénétiques (**Loiseau et al., 2020**). Six des 16 spoligotypes détectés dans notre étude sont également mentionnés dans cette publication récente. La capacité discriminatoire du spoligotypage est limitée puisque la diversité est mesurée à un seul locus sujet à une évolution convergente et que les distances phylogénétiques ne peuvent être déduites de manière fiable (**Comas et al., 2009**). Malgré cette limitation, nos résultats ont permis d'indiquer la position phylogénétique des souches et de montrer la multiplicité des lignées clonales circulant en Algérie. D'autres études, faisant appel à la technologie WGS, seront nécessaires pour déterminer si et dans quelle mesure l'épizootie actuelle de tuberculose en Algérie provient de l'évolution à long terme au cours de laquelle les mycobactéries du complexe tuberculosis adaptés aux animaux, c'est-à-dire *M. caprae* et *M. bovis*, pourraient être originaires d'Afrique (**Brites et al., 2018**) ou d'une réintroduction plus récente de *M. bovis* à partir d'Europe, comme indiqué ci-dessus.

✦ Typage par MIRU-VNTR

Dans la présente étude, nous avons analysé un panel de 19 loci MIRU-VNTR. Le choix des loci évalués a été effectué conformément au panel de 12 loci proposé par le site Web MIRU-VNTR plus en combinaison avec le panel proposé par le Centre européen de référence pour la tuberculose (EU-RL). A partir des 60 souches analysées par spoligotypage, 42 souches ont pu être typées par MIRU-VNTR à cause de la qualité des ADN.

L'analyse des résultats obtenus par cette technique montre que sur les 19 loci analysés, sept ; VNTR577 (HGDI =0,5598), 2163a (HGDI =0,6927), 2163b (HGDI =0,6887), 2165 (HGDI =0,7573), 2461(HGDI =0,5796), 3007(HGDI =0,5703), et 3232 (HGDI =0,7178), ont présenté un pouvoir discriminant élevé (HGDI > 0,50). Ceci est cohérent avec les données rapportées sur des souches de *M. bovis* au Mexique et en Allemagne (**Bolado-Martínez et al., 2015 ; Kohl et al., 2020**). À l'inverse, **Rodriguez-Campos et al. (2013)**, n'ont constaté qu'une très faible diversité allélique pour le locus VNTR2163b (HGDI =0,08), mais l'analyse a porté uniquement sur les souches appartenant au spoligotype SB0121. Nos résultats sont en corrélation avec les données antérieures obtenues en Tunisie (**Djemal et al., 2017**), qui ont

noté une résolution élevée des loci VNTR2163b, 2461, 2165, 3232 et 2163a et avec les résultats obtenus par **Sanou et al. (2014)** qui ont également indiqué l'efficacité des trois loci VNTR 2165, 2461 et 2163a dans le typage de *M. bovis*. De manière similaire, les quatre loci VNTR3007, 2165, 2461 et 577 ont montré un pouvoir discriminant intéressant pour les souches algériennes de *M. bovis* selon les données précédentes (**Sahraoui et al., 2010**). A noter, que le loci VNTR 3007 ne figure pas dans le panel des loci recommandés par le laboratoire de référence de tuberculose (EU-RL) pour le typage moléculaire des souches de *M. bovis*.

Nos résultats ont montré que les deux loci VNTR3192 et 4052 présentent une diversité allélique modérée (HGDI = 0,36, HGDI = 0,47 respectivement) alors que le locus VNTR580 montre une diversité allélique faible (HGDI = 0,18). Une très faible diversité allélique (<0,15) est observée pour les six loci analysés (VNTR154, 802, 2059, 2687, 2996 et 4348). Cependant, **Yang et al. (2015)**, ont observé une diversité allélique élevée avec les loci VNTR580 (HGDI = 0,607) et 802 (HGDI = 0,495), mais aucun pouvoir discriminant n'a été observé pour les loci VNTR2059, 2687 et 2996. Cette différence peut être liée à l'espèce animale à partir de laquelle les souches ont été isolées. D'autre part selon **Hlokwe et al. (2013)** le potentiel discriminant de certains locus n'est pas le même d'un pays à l'autre, certains loci sont efficaces dans un pays mais ne le sont pas dans un autre. Nous avons analysé exclusivement des souches bovines Algériennes alors que **Yang et al. (2015)** ont typé des souches provenant de cerfs du nord de la Chine.

Contrairement aux résultats de **Sahraoui et al. (2010)** avec le loci VNTR 2996 (HGDI =0,22), nos résultats ont montré une très faible diversité allélique (HGDI =0,047) avec ce même loci. Une explication possible pourrait être liée au petit nombre d'isolats testés dans notre étude et ainsi moins de variant sont détectés.

Le pouvoir discriminant des loci peut être différent entre les espèces bactériennes du même complexes de *M. tuberculosis* (**Yang et al., 2015**), par exemple les loci 960 et 2531 sont très discriminants pour *M. tuberculosis* (**Bouklata et al., 2015**), alors qu'ils sont moins discriminants pour *M. bovis* selon nos résultats. Nous suggérons que les loci VNTR960 (HGDI = 0), 1644(HGDI = 0) et 2531(HGDI = 0), ne sont pas efficaces pour le typage moléculaire des souches algériennes de *M. bovis*.

Nos résultats ont montré un pouvoir discriminant intéressant (HGDI =0,8294) pour la technique de spoligotype, celui-ci est similaire à celui obtenu en Tunisie (**Djemal et al., 2017**) mais supérieur à celui de **Sahraoui et al. (2009)** en Algérie, de **Andrievskaia et al. (2018)** au Canada et celui de **McLernon et al. (2010)** en République d'Irlande.

Nos résultats ont montré un pouvoir discriminant relativement élevé du typage par technique 19 loci MIRU-VNTR (HGDI=0,9779). Ces résultats corroborent ceux de **Carvalho et al. (2016)** et **Shimizu et al. (2014)**. Par contre, le pouvoir discriminant obtenu dans notre étude par l'intermédiaire de cette technique est supérieur à celui obtenu par **Parreiras et al. (2012)** au Brésil (HGDI =0,86) utilisant le panel de 12 loci. Ainsi, le nombre de loci joue un rôle important dans la valeur du pouvoir discriminant de la méthode MIRU-VNTR. Selon nos résultats, une meilleure discrimination des souches de *M. bovis* est observée par la combinaison des deux techniques de typage moléculaire (HGDI = 0,9826).

L'analyse des résultats permet de voir que le typage par 19 loci MIRU-VNTR de 42 souches de *M. bovis* a révélé 32 profils différents parmi lesquels 27 sont uniques. La combinaison des MIRU-VNTR et du spoligotypage montre une grande variété génotypique avec 33 profils dont 13 pour le SB0120, 5 pour le SB0121 et 5 pour le SB0134, ce qui reflète l'hétérogénéité des souches responsables de la tuberculose en Algérie.

En effet, la combinaison des résultats de la diversité allélique des MIRU-VNTR et des profils de spoligotypage nous a permis de dévoiler certains liens épidémiologiques possibles. Ainsi, la construction de l'arbre phylogénétique a révélé la présence de cinq clusters (spoligotype et profil MIRU-VNTR identiques ou ne différant que par 3 allèles au maximum) incluant 14 souches. Le cluster le plus large comprend quatre souches, cas des spoligotypes SB0121 et SB2521. Le reste des clusters inclue chacun deux souches uniquement.

Les résultats montrent que les bactéries appartenant au cluster du spoligotype SB2521 sont représentées par quatre souches provenant de bovins de l'abattoir d'Hussein Dey. Il est important de supposer que l'infection croisée s'est produite entre les animaux d'un même troupeau ou d'une même zone. Si nous supposons que ces animaux appartiennent à un même troupeau ou à une même zone, nous pouvons soupçonner une infection croisée entre ces animaux, malheureusement nous ne disposons d'aucune donnée sur l'origine des animaux à savoir l'élevage afin de pouvoir établir un lien épidémiologique.

Fait intéressant, les deux clusters du spoligotype SB0121 (4 et 2 souches) contiennent des souches provenant probablement de différentes régions d'Algérie, car les souches ont été isolées de bovins abattus dans différents abattoirs (Hussein Dey et Hadjout, Hussein Dey et El Harrach). Comme nous considérons qu'il est peu probable qu'un même propriétaire ait livré son bétail à différents abattoirs, l'apparition de profils spoligotype/MIRU-VNTR identiques dans différentes zones géographiques pourrait s'expliquer par le commerce d'animaux entre les troupeaux de ces zones.

Nos résultats montrent que dans deux clusters, deux spoligotypes différents (SB0848 et SB0121 ainsi que le SB0828 et SB0120) sont combinés. Les deux paires ne diffèrent l'une de l'autre que par un seul espaceur (le n° 13 est manquant dans le SB0848 par rapport au SB0121 ainsi que le n° 34 qui est manquant dans le SB0828 par rapport au SB0120). Il est possible que les spoligotypes SB0828 et SB0848 soient issus des spoligotypes SB0120 et SB0121 respectivement, en subissant une mutation génétique sur l'espaceur 13 et 34 respectivement. La souche unique SB0848 et les quatre souches SB0121 possèdent des profils MIRU-VNTR identiques, ce qui confirme l'étroite parenté des deux spoligotypes.

Conclusion et recommandations

Conclusion

Au jour d'aujourd'hui, la tuberculose demeure un grand fléau en Algérie, tant pour la santé publique vétérinaire que pour la biodiversité.

Notre étude révèle que la prévalence de la tuberculose bovine à l'examen post-mortem est relativement faible, un résultat qui pourrait être probablement sous-estimé, car dans certains cas, les lésions peuvent ne pas être suffisamment développées pour pouvoir être détectées lors de l'inspection de routine aux abattoirs. La principale voie de transmission de la tuberculose bovine est l'appareil respiratoire, ce qui implique un contact étroit entre les animaux favorisant la transmission de la bactérie d'un animal à l'autre. La culture des mycobactéries au laboratoire, les outils de diagnostic moléculaire et l'inspection des viandes à l'abattoir constituent des outils fiables pour le contrôle de la maladie. Le sexe de l'animal, l'âge et la saison sont des facteurs de risque très importants associés à l'infection tuberculeuse. Les mâles sont plus sensibles à l'infection que les femelles. Les animaux jeunes et adultes sont plus sensibles à l'infection que les animaux plus âgés. La saison sèche semble être la période la plus favorable à la propagation de la maladie. Les spoligotypes SB0120 et SB0121 appartenant au cluster BCG sont les types les plus fréquents circulant en Algérie et également dans le monde. L'analyse des quatre loci MIRU-VNTR [ETR A, VNTR2163b (QUB11b), 2163a (QUB11a), et 3232 (QUB3232)] est suffisante pour une bonne caractérisation des souches algériennes de *M. bovis*, bien que la combinaison des MIRU-VNTR et du spoligotypage demeure fortement recommandée. L'association de ces deux techniques met en évidence la multiplicité des populations algériennes des souches de *M. bovis*, indiquant l'hétérogénéité des souches responsables de la tuberculose bovine en Algérie. Le manque d'informations concernant l'origine des bovins étudiés (troupeau, pays) ne permet pas de tracer les voies de transmission de la tuberculose en Algérie et doit être prise en considération dans le cadre du programme de lutte pour l'éradication de la maladie en Algérie.

Nos résultats devraient interpeller les autorités sanitaires compétentes afin d'adopter une stratégie alternative de contrôle et des mesures appropriées pour la prévention de la tuberculose en Algérie, notamment par l'installation de laboratoires spécialisés dans le diagnostic de la tuberculose animale.

Recommandations et perspectives

- ↗ A l'heure actuelle, il s'avère nécessaire d'évaluer les performances de l'ensemble du système de surveillance en termes de coût et d'efficacité, et d'évaluer la contribution relative de chacune de ces composantes, tant au niveau national que régional. S'il est clair que la stratégie de lutte contre la tuberculose en Algérie contribue à la détection des troupeaux infectés, son impact relatif n'a jamais été évalué. Dans ce contexte, les mesures actuellement mises en œuvre dans le cadre du programme d'éradication doivent être réévaluées.
- ↗ La mise en œuvre d'une politique de « test et d'abattage » des bovins pour l'ensemble du pays serait la stratégie idéale, mais elle est irréaliste à l'heure actuelle, compte tenu des limites en ressources humaines et financières.
- ↗ Dans un contexte de réduction des coûts nécessaires à l'éradication de la tuberculose en Algérie, la fréquence des tests devrait être adaptée en fonction des stratégies de surveillance fondées sur le risque, c'est-à-dire que les efforts devraient se concentrer sur les troupeaux les plus susceptibles d'être infectés.
- ↗ Une meilleure caractérisation du risque de tuberculose dans le troupeau sera basée non seulement sur la prévalence dans la zone, mais aussi sur d'autres caractéristiques du troupeau (Ex : type de production), ce qui permettrait une meilleure répartition des ressources pour la surveillance de la maladie.
- ↗ Le recours aux tests de contrôle avant tout déplacement des animaux vers d'autres exploitations devrait être évalué.
- ↗ Une alternative pour augmenter la sensibilité des tests de contrôle de routine et augmenter ainsi la probabilité de détection d'animaux infectés, serait d'envisager l'utilisation de test sérologique de l'IFN- γ en combinaison avec le test cutané.
- ↗ Le succès de l'éradication de la tuberculose repose non seulement sur l'identification des troupeaux infectés mais aussi sur l'élimination des troupeaux identifiés comme infectés.
- ↗ Le contrôle des mouvements des animaux.
- ↗ L'organisation par le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural en lien avec les parties prenantes, d'audits, de cours et des formations pour les vétérinaires qui effectuent les contrôles par test intradermique sur terrain.
- ↗ Le renforcement de la coordination entre les autorités responsables de la santé animale et celles responsables de l'inspection aux abattoirs.

- Malgré sa contribution apparemment limitée à la sensibilité globale du système de surveillance de la tuberculose, la détection aux abattoirs peut encore jouer un rôle important dans la détection des animaux " anergiques ". Il s'agit d'animaux infectés de manière chronique chez lesquels la réponse immunitaire à médiation cellulaire peut être déprimée, et donc non détectable par le test cutané ou l'interféron gamma, mais qui sont susceptibles d'avoir développé des lésions macroscopiques et donc d'être détectés par l'inspection post-mortem à l'abattoir. De plus, selon le rapport de l'Union Européenne, la surveillance de la maladie aux abattoirs a prouvé sa capacité à détecter des animaux infectés par les mycobactéries du complexe tuberculosis qui autrement seraient passés inaperçus.
- Le lait reste une source potentielle de transmission de la tuberculose zoonotique. Il serait judicieux de focaliser les analyses de laboratoire sur ce produit, notamment par des essais d'isolement de *M. bovis*.
- Les capacités discriminantes et de stabilité font que la combinaison des deux techniques de spoligotypage et MIRU-VNTR pourrait remplacer d'autres techniques de typage du *M. bovis* plus fastidieuses et plus coûteuses telle que la RFLP.
- Il est de plus en plus clair que le génotypage des souches de *M. bovis* est un outil utile pour identifier les voies de transmission possibles de la tuberculose, et que le génotype des isolats de *M. bovis* dépend largement de la zone géographique.
- Avec les résultats des enquêtes épidémiologiques et des requêtes de traçabilité des animaux en amont et en aval des foyers, le typage moléculaire complet et continu des souches de *M. bovis* est un autre élément qui permettra de dresser ultérieurement un bilan épidémiologique de la dynamique d'infection de la TB en Algérie. Toutefois, la définition de lignée devra être approfondie sur base d'analyses moléculaires complémentaires et d'un suivi longitudinal de souches isolées à partir de foyers ayant des liens épidémiologiques établis entre eux.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta S (2016). Genomebased phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 66: 5575–5599.
- Alexander KA., Laver PN., Michel AL., Williams M., van Helden PD., Warren RM., van Pittius NCG (2010). Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi. Emerg Infect Dis. 16(8): 1296-1299.
- Allen AR., Skuce RA., Byrne AW (2018). Bovine Tuberculosis in Britain and Ireland - A Perfect Storm? The Confluence of Potential Ecological and Epidemiological Impediments to Controlling a Chronic Infectious Disease. Front Vet Sci. 5: 109.
- Allix C., Walravens K., Saegerman C., Godfroid J., Supply P., Fauville-Dufaux M(2006).Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping.J Clin Microbiol.44(6) :1951–1962.
- Amanfu W (2006). The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. Tuberculosis (Edinb). 86(3-4):330-335.
- Ameni G., Aseffa A., Engers H., Young D., Gordon S., Hewinson G., Vordermeier M (2007). High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. Clin Vaccine Immunol. 14(10):1356-1361.
- Aranaz A., De Juan L., Montero N., Sanchez C., Galka M., Delso C., et al (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. J Clin Microbiol. 42(6):2602-8.
- Asebe G (2017). Molecular Characterization of *Mycobacterium bovis* and its Significance: Role for Control of Zoonotic Tuberculosis in Africa. JMDM. 6(3):1-10.
- Ayad A, Bensid A, Benabdelhak AC, Ait-Yahia F, Dergal NB (2020). First report on tuberculosis based on slaughterhouse data in Bejaia province, Algeria: a retrospective 10-year survey. Kocatepe Vet J. 13(2):118-124.
- Ayele WY., Neill SD., Zinsstag J., Weiss MG., Pavlik I (2004). Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis. 8(8):924–937.
- Belachew T., (2017). Review on Bovine Tuberculosis. Dairy and Vet Sci J. 3(3).

- Berg S., Firdessa R., Habtamu M., Gadisa E., Mengistu A., Yamuah L., et al (2009). The burden of mycobacterial disease in ethiopian cattle: implications for public health. PLoS One. 4(4):e5068.
- Berg S., Garcia-Pelayo MC., Muller B., Hailu E., Asiimwe B., Kremer K., Dale J., Boniotti MB., Rodriguez S., Hilty M., Rigouts L., Firdessa R., Machado A., Mucavele C., Ngandolo B. N., Bruchfeld J., Boschiroli L., Muller A., Sahraoui N., Pacciarini M., Cadmus S., Joloba M., van Soolingen D., Michel A. L., Djonne B., Aranaz A., Zinsstag J., van Helden P., Portaels F., Kazwala R., Kallenius G., Hewinson R. G., Aseffa A., Gordon SV., Smith NH(2011). African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. J Bacteriol. 193(3): 670-678.
- Biek R., O'Hare A., Wrigh, D., Mallon T., McCormick C., Orton RJ., McDowell S., Trewby H., Skuce RA., Kao RR (2012). Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of *Mycobacterium bovis* in sympatric cattle and badger populations. PLoS Pathog. 8(11): e1003008.
- Biet F., Boschiroli ML., Thorel MF., Guilloteau LA(2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet Res.36: 411-436.
- Biffa D., Asseged., Bogale A., Godfroid J.,Skjerve E (2012). Factors associated with severity of bovine tuberculosis in Ethiopian cattle.Trop Anim Health Prod. 44:991–998.
- Biffa D., Skjerve E., Oloya J., Bogale A., Abebe F., Dahle U., et al (2010). Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from Ethiopian cattle. BMC Vet Res. 6:28.
- Böddinghaus B., Rogall T., Flohr T., Blöcker H., Böttger E (1990). Detection and Identification of *Mycobacteriaby* Amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 28 (8): 1751-1759.
- Bolado-Martinez E., Benavides-Davila I., Candia-Plata Mdel C., Navarro-Navarro M., Aviles-Acosta M., Alvarez-Hernandez G (2015). Proposal of a Screening MIRU-VNTR Panel for the Preliminary Genotyping of *Mycobacterium bovis* in Mexico. Biomed Res Int.2015:416479.
- Bolaños CAD., de Paula CL., Guerra ST., Marília Masello Junqueira Franco, Márcio Garcia Ribeiro (2017). Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview. Rev Inst Med Trop São Paulo. 59:e40.

- Boniotti MB., Gorla M., Loda D., Garrone A., Benedetto A., Mondo A., et al (2009). Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J Clin Microbiol.*47(3):636-44.
- Boschirola ML., Michelet L., Hauer A., de Cruz K., Courcoule A., Hénault S., et al (2015). Tuberculose bovine en France: cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000-2013. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation.* 70:2-8.
- Bouklata N., Supply P., Jaouhari S., Charof R., Seghrouchni F., Sadki K., et al (2015). Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex by 24-Locus Based MIRU-VNTR Typing in Conjunction with Spoligotyping to Assess Genetic Diversity of Strains Circulating in Morocco. *PLoS One.*10(8):e0135695.
- Brennan PJ., Nikaido H (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 64: 29–63.
- Brites D., Loiseau C., Menardo F., Borrell S., Boniotti MB., Warren R., et al (2018). A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Frontiers in microbiology.*9:2820.
- Brosch R., Gordon SV., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons LM., Pym AS., Samper S., van Soolingen D., Cole ST (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(6): 3684-3689.
- Brosch R., Gordon SV., Pym A., Eiglmeier K., Garnier T., Cole ST (2000). Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol.* 290(2): 143-152.
- Brotherstone S., White IMS., Coffey M., Downs SH., Mitchell AP., Clifton-Hadley RS., More SJ., Good M., Woolliams JA (2010). Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *J Dairy Sci.* 93(3): 1234-1242.
- Brudey K., Driscoll JR., Rigouts L., Prodinger WM., Gori A, Al-Hajj SA., et al (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 6: 23.
- Buddle BM., de Lisle GW., Griffin JFT., Hutchings SA (2015). Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *N Z Vet J.* 63 Suppl 1(sup1): 19-27.

- Buddle BM., Livingstone PG., de Lisle GW (2009). Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet J.* 57(4): 173-180.
- Cachafeiro-Vilar A., García-Padilla C., Reyes E., Hernández-Molina G (2007). Polyarthrite due à *Mycobacterium bovis*. *Revue du Rhumatisme.* 74(1): 117-119.
- Campbell I., Drobniowski F., Novelli V., Ormerod P., Pozniak A (2000). Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax.* 5:210–218.
- Cayrou C., Turenne C., Behr MA., Drancourt M (2010). Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiol.* 156(Pt 3) : 687-694.
- Clarke C., van Helden P., Miller M., Parsons S (2016). Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African subregion. *J S Afr Vet Assoc.* 87(1): a1322.
- Clegg TA., Doyle M., Ryan E., More SJ., Gormley E (2019). Characteristics of *Mycobacterium bovis* infected herds tested with the interferon-gamma assay. *Prev Vet Med.* 168: 52-59.
- Cole ST., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., et al (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393 (6685):537–544.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James K D, Thomson N R, Wheeler P R et al (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 409(6823):1007-11.
- Comas I., Homolka S., Niemann S., Gagneux S (2009). Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One.* 4(11):e7815.
- Courcoul A., Moyon JL., Brugère L., Faye S., Hénault S., Gares H., Boschirola ML (2014). Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS One.* 9(3): e90334.
- Cousins DV (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech.* 20 (1): 71-85.
- Cousins DV., Florisson N (2005). A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev Sci Tech.* 24 (3): 1039-1059.

- Cousins DV., Francis BR., Gow BL(1989). Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol. 20 (1): 89-95.
- Couvin D., Rastogi N (2014). La mise en place de bases de données des génotypes circulants du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et des outils web permettant de mieux surveiller, comprendre et contrôler l'épidémie de la tuberculose dans le monde. ANSES (France). 12 : 40-53.
- Couvin D., Rastogi N (2014). La mise en place de bases de données des génotypes circulants du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et des outils web permettant de mieux surveiller, comprendre et contrôler l'épidémie de la tuberculose dans le monde. (12):pp 40-53.
- Cowie CE., Hutchings MR., Barasona JA., Gortázar C., Vicente J., White PCL (2015). Interactions between four species in a complex wildlife: livestock disease community: implications for *Mycobacterium bovis* maintenance and transmission. Eur J Wildlife Res. 62(1):51-64.
- Damene H., Tahir D., Diels M., Berber A., Sahraoui N., Rigouts L (2020). Broad diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from humans and cattle in Northern Algeria suggests a zoonotic transmission cycle. PLoS Negl Trop Dis.14(11):e0008894.
- Dametto LL., dos Santos ED., Santos LR., Dickel EL (2020). Bovine tuberculosis: diagnosis in dairy cattle through the association of analyzes. Pesq Vet Bras. 40(1):12-16
- Dana TD., Dulo F., Tafere A., Hayesso S (2018). A review on bovine tuberculosis and its diagnostic. Acad J Anim Diseases. 7(3): 59-67.
- Dawson KL., Bell A., Kawakami RP., Coley K., Yates G., Collins DM (2012). Transmission of *Mycobacterium orygis* (*M. tuberculosis* complex species) from a tuberculosis patient to a dairy cow in New Zealand. J Clin Microbiol. 50(9): 3136-3138.
- de Beer JL., Kremer K., Kodmon C., Supply P., van Soolingen D(2012). First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol. 50(3): 662-669.
- de la Fuente J., Diez-Delgado I., Contreras M., Vicente J., Cabezas-Cruz A., Tobes R., et al (2015). Comparative Genomics of Field Isolates of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* Provides Evidence for Possible Correlates with Bacterial Viability and Virulence. PLoS Negl Trop Dis.9(11):e0004232.

- De la Rua-Domenech R., Goodchild AT., Vordermeier HM., Hewinson RG., Christiansen KH., Clifton-Hadley RS (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*. 81(2):190-210.
- Dean AS., Forcella S., Olea-Popelka F., El Idrissi A., Glaziou P., Benyahia A., Mumford E., Erlacher-Vindel E., Gifford G., Lubroth J., Raviglione M., Fujiwara P (2018). A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 18(2): 137-138.
- Dejene SW., Heitkonig IMA., Prins HHT., Lemma FA., Mekonnen, DA., Alemu ZE., Kelkay TZ., de Boer WF (2016). Risk Factors for Bovine Tuberculosis (bTB) in Cattle in Ethiopia. *PLoS One*. 11(7): e0159083.
- Delaune D., Janvier F., Rapp C., Gêrôme P., Fabre M., Soler C., Mérens A (2012). Actualités de l'infection à *Mycobacterium bovis* en France : à propos de 4 cas. *Ann Biol Clin*. 70: 231–236.
- Demay C., Liens B., Burguiere T., Hill V., Couvin D., Millet J., et al (2012). SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 12(4):755-66.
- Desikan S., Narayanan (2015). Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res*. 141: 761–774.
- Desikan S., Narayanan S(2015). Genetic markers, genotyping methods and next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res*. 141(6):761-774.
- Dibaba AB., Daborn CJ (2019). Epidemiology of Bovine Tuberculosis in Africa. *Tuberculosis in Animals: An African Perspective*. 89–126.
- Dippenaar A., Parsons SDC., Sampson SL., van der Merwe RG., Drewe JA., Abdallah AM.,et al (2015). Whole genome sequence analysis of *Mycobacteriumsuricattae*. *Tuberculosis(Edinb)*. 95(6): 682-688.
- Djemal SE., Siala M., Smaoui S., Kammoun S., Marouane C., Bezos J., et al (2017). Genetic diversity assessment of Tunisian *Mycobacterium bovis* population isolated from cattle. *BMC Vet Res*. 13(1):393.
- Domingo M., Vidal E., Marco A., (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 97 Suppl: S20-9.

- Domogalla J., Prodinger WM., Blum H., Krebs S., Gellert S., Muller M., Neuendorf E., Sedlmaier F., Buttner M (2013). Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. J Clin Microbiol. 51(5): 1381-1388.
- Duignan A., Good M., More SJ (2012). Quality control in the national bovine tuberculosis eradication programme in Ireland. Rev Sci Tech. 31 (3): 845-860.
- Duignan A., Good M., More SJ (2012). Quality control in the national bovine tuberculosis eradication programme in Ireland. Rev Sci Tech.31(3):845-60.
- Durand B., Gouyet L., Ostyn A., Thorel MF., Haddad N (2004). Intérêt épidémiologique du typage moléculaire de *Mycobacterium bovis*. Bulletin des GTV. 23: 47-49.
- Durr PA., Hewinson RG., Clifton-Hadley RS (2000). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. Rev Sci Tech.19(3):675-88. Epub 2000/01/11.
- Durr PA., Hewinson RG., Clifton-Hadley RS(2000). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis I. *Mycobacterium bovis* genotyping. Rev Sci Tech.19 (3): 675-688.
- EFSA, Autorité européenne de sécurité des aliments (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. EFSA J. 12, 169.
- EFSA, Autorité européenne de sécurité des aliments, (2012).The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. 10(3):2597.
- Eisenstadt J., HALL GS (1995). Microbiology and Classification of *Mycobacteria*. Clin Dermatol. 13 (3):197-206.
- El Mrini M., Kichou F., Kadiri A., Berrada J., Bouslikhane M., Cordonnier N., et al (2016). Animal tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Eurasian wild boar from Morocco. Eur J Wildlife Res. 62(4):479-82.
- Euzéby JP (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. Int J of Syst Bacteriol. 47(2):590-592.
- Evangelista TBR., De Anda JHG (1996). Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. exposure associated with management of colostrum and milk. Prev Vet Med. 27 (1-2) : 23-27.
- Fedrizzi T., Meehan CJ., Grottola A., Giacobazzi E., Serpini GF., Tagliazucchi S., Fabio A., Bettua C., Bertorelli R., De Sanctis V., Rumpianesi F., Pecorari M., Jousson O., Tortoli

- E., Segata N (2017). Genomic characterization of Non tuberculous Mycobacteria. Sci Rep. 7: 45258.
- Fontana S., Pacciarini M., Boifava M., Pellesi R., Casto B., Gastaldelli M., Koehler H., Pozzato N., Casalnuovo F., Boniotti MB (2018). Development and evaluation of two multi-antigen serological assays for the diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. J Microbiol Methods. 153: 118-126.
 - Forbes BA., Hall GS., Miller MB., Novak SM., Rowlinson MC., Salfinger M., Somoskövi A., Warshauer DM., Wilson ML (2018). Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 31 (2): e00038-17.
 - Frothingham R., Meeker-O'Connell WA (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiol. 144 (5): 1 189-1 196.
 - Frothingham R., Meeker-O'Connell WA (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 144 (Pt 5):1189-96.
 - Garnier T., Eiglmeier K., Camus JC., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler PR., Parkhill J., Barrell BG., Cole ST., Gordon SV., Hewinson RG (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci. 100(13):7877-7882.
 - Garrity G., Brenner DJ., Krieg NR., Staley JT (2005). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria (Part C). Edition Number 2, Springer US.
 - Gcebe N., Hlokwe TM (2017). Non-tuberculous Mycobacteria in South African Wildlife: Neglected Pathogens and Potential Impediments for Bovine Tuberculosis Diagnosis. Front Cell Infect Microbiol. 7:15.
 - Ghavidel M., Mansury D., Nourian K., Ghazvini K (2018). The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; A systematic review. Microb Pathog. 118:310-5.
 - Gilbert M., Mitchell A., Bourn D., Mawdsley J., Clifton-Hadley R., Wint W (2005). Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. Nature. 435 : 491–496
 - Good M., Bakker D., Duignan A., Collins DM (2018). The History of In Vivo Tuberculin Testing in Bovines: Tuberculosis, a "One Health" Issue. Frontiers in Veterinary Science. 5: 59.

- Grange JM (2001). *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis (Edinb). 81(1-2):71-77.
- Grange JM., Collins CH. (1997). Tuberculosis and the cow. Journal of the Royal Society of Health. 117(2): 119-122.
- Grange JM., Daborn C., Cosiv O (1994). HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. Eur Respir J. 7(9): 1564–1566.
- Griffith DE., Aksamit T., Brown-Elliott BA., et al (2007). “An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment and prevention of non-tuberculous mycobacterial,” J Respir Crit Care Med. 175:367–416.
- Grosset J., Boisvert H., Truffot-Pernot C (1990). Mycobactéries. In : Bactériologie médicale. Le Minor L., Veron M. Ed Flammarion, Paris 1990 : pp 965-1017.
- Grosset J., Truffot-Pernot C., Boisvert H., Lalande V (1991). Qu’est-ce que les mycobactéries atypiques ? Médecine et Maladies Infectieuses. 21(2) :7-15.
- Gupta RS., Lo B., Son J (2018). Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. Front Microbiol. 13(9):67.
- Gutierrez MC., Brisse S., Brosch R., Fabre M., Omaïs B., Marmiesse M., Supply P., Vincent V (2005). Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathogens. 1 (1): e5.
- Haddad N., Masselot M., Durand B (2004). Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res Vet Sci. 76(1):1-18.
- Haddad N., Ostyn A., Karoui O., Thorel MF., Durand B (2002). Épidémiologie moléculaire de *Mycobacterium bovis* en France. Bull Acad Vét de France. 155:119-130.
- Hauer A., De Cruz K., Cochard T., Godreuil S., Karoui C., Henault S., et al (2015). Genetic Evolution of *Mycobacterium bovis* Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978. Plos One. 10(2).
- Hoefsloot W., Van Ingen J., Andrejak C., Ängeby K., Bauriaud R., Bemer P., et al (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 42: 1604– 1613.
- Huard RC., Fabre M., de Haas P., Lazzarini LC., van Soolingen D., Cousins D., Ho JL (2006). Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Bacteriol. 188(12): 4271-4287.

- Humblet MF., Gilbert M., Govaerts M., Fauville-Dufaux M., Walravens K., Saegerman C (2010). New Assessment of Bovine Tuberculosis Risk Factors in Belgium Based on Nationwide Molecular Epidemiology. *J Clin Microbiol.* 48(8): 2802-2808.
- Hunter PR., Gaston MA (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 26(11):2465-6. Epub 1988/11/01.
- Iketleng T., Lessells R., Dlamini MT., Mogashoa T., Mupfumi L., Moyo S., Gaseitsiwe S., de Oliveira T (2018). *Mycobacterium tuberculosis* next-generation whole genome sequencing: opportunities and challenges. *Tuberc Res Treat.* 1298542.
- Jagielski T., van Ingen J., Rastogi N., Dziadek J., Mazur PK., Bielecki J (2014). Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Biomed Res Int.* 645802.
- Jankute M., Cox JAG., Harrison J., Besra GS (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu Rev Microbiol.* 69:405-23.
- Journal Officiel de la Republique Algerienne (JORA) N°16. Decret exécutif n°06-118 du 12 Safar 1427 correspondant au 12 Mars 2006 complétant le décret exécutif n°88-252 du 31 Décembre 1988 fixant les conditions d'exercice à titre privé des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux. 2006-03-15.
- Kahn LH (2011). The need for one health degree programs. *Infection Ecology and Epidemiology.*1: 7919.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., et al (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.*35(4):907-14.
- Kamerbeek K., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Van Embden J (2006). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 35 (4): 907–914.
- Kao RR., Price-Carter M., Robbe-Austerman S (2016). Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission. *Rev Sci Tech.*;35(1):241-58.
- Kao RR., Price-Carter M., Robbe-Austerman, S (2016). Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission. *Rev Sci Tech.* 35(1): 241-258.
- Katale BZ., Mbugi EV., Siame KK., Keyyu JD., Kendall S., Kazwala RR., et al (2017). Isolation and Potential for Transmission of *Mycobacterium bovis* at Human-livestock-

- wildlife Interface of the Serengeti Ecosystem, Northern Tanzania. *Transbound Emerg Dis.* 64(3):815-25. Epub 2015/11/14.
- Kazda J., Pavlik I., Falkinham IIIJ O., Hruska K (2009). Key Research Issues. In *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health*. Springer, Dordrecht. pp331-338.
 - Kent PT., Kubica GP (1985). *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control, Atlanta.
 - Kieser KJ., Rubin EJ (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol.* 12: 550-62.
 - Koh WJ., Kwon OJ., Lee KS (2002). Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases in Immunocompetent Patients. *Korean J Radiol.* 3(3):145-157.
 - Kohl TA., Kranzer K., Andres S., Wirth T., Niemann S., Moser I (2020). Population structure of *Mycobacterium bovis* in Germany: A long-term study using Whole Genome Sequencing combined with conventional molecular typing methods. *J Clin Microbiol.*
 - Kohl TA., Utpatel C., Niemann S., Moser I (2018). *Mycobacterium bovis* Persistence in Two Different Captive Wild Animal Populations in Germany: a Longitudinal Molecular Epidemiological Study Revealing Pathogen Transmission by Whole-Genome Sequencing. *J Clin Microbiol.* 56(9).
 - Koro Koro F., Ngatchou AF., Portal JL., Gutierrez C., Etoa FX., Eyangoh SI (2015). The genetic population structure of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at the Yaoundé and Douala abattoirs in Cameroon. *Rev Sci Tech.* 34 (3): 1001-1010.
 - Kuria JKN (2019). Diseases Caused by Bacteria in Cattle: Tuberculosis. In *Bacterial Cattle Diseases* Edited by Hussein Abdel hay El-Sayed Kaoud. Published: August 7th 2019. Print ISBN: 978-1-83881-229-4, eBook (PDF), ISBN: 978-1-83881-231-7.
 - Lamine-Khemiri H., Martinez R., Garcia-Jimenez WL., Benitez-Medina JM., Cortes M, Hurtado I., et al (2014). Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle of Tunisia. *Trop Anim Health Prod.* 46(2):305-11.
 - Le Roex N., van Helden PD., Koets AP., Hoal EG (2013). Bovine TB in livestock and wildlife: what's in the genes? *Physiol Genomics.* 45 (5): 631–637.
 - Lee K., Brumme ZL (2013). Operationalizing the One Health approach: the global governance challenges. *HPP.* 28:778–785.

- Li L., Bannantine JP., Zhang Q., Amonsin A., May BJ., Alt D., Banerji N., Kanjilal S., Kapur V(2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci.102: 12344–12349.
- Li X., Chen L., Zhu Y., Yu X., Cao J., Wang R., Lv X., He J., Guo A.,Huang H., Zheng H., Liu S (2015). Genomic analysis of a *Mycobacterium bovis* bacillus [corrected] Calmette-Guerin strain isolated from an adult patient with pulmonary tuberculosis. PLoS One. 10(4): e0122403.
- Liss GM., Wong L., Kittle DC., Simor A., NausM., Martiquet P., Misener CR(1994). Occupational exposure to *Mycobacterium bovis* infection in deer and elk in Ontario. Can J Public Heal. 85: 326–329.
- LoBue PA., LeClair JJ., Moser KS (2004).Contact investigation for cases of pulmonary *Mycobacterium bovis*.Int J Tuberc Lung Dis. 8(7):868–872.
- Loiseau C., Menardo F., Aseffa A., Hailu E., Gumi B., Ameni G., et al (2020). An African origin for *Mycobacterium bovis*. Evol Med Public Health. 1:49-59.
- Machado A., Rito T., Ghebremichael S., Muhate N., Maxhuza G., Macuamule C., et al (2018). Genetic diversity and potential routes of transmission of *Mycobacterium bovis* in Mozambique. PLoS Negl Trop Dis.12(1):e0006147.
- Magee JG., Ward AC (2015). *Mycobacterium*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, pp 1–84. 7
- Malama S., Johansen TB., Muma JB., Munyeme M., Mbulo G., Muwonge A., et al (2014). Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. Vet Med Int.2014:187842.
- Marais BJ., BrittleW., Painczyk K., Hesseling AC., Beyers N., Wasserman E., van Soolingen D., Warren RM (2008). Use of Light-Emitting Diode Fluorescence Microscopy to Detect Acid-Fast Bacilli in Sputum.Clinical Infectious Diseases, 47 (2): 203–207.
- Marianelli C., Amato B., Boniotti MB., Vitale M., Pruiti Ciarello F., Pacciarini ML., et al (2019). Genotype diversity and distribution of *Mycobacterium bovis* from livestock in a small, high-risk area in northeastern Sicily, Italy. PLoS Negl Trop Dis.13(7):e0007546.
- Martin C., Denis F (2011). *Mycobactéries* In Bactériologie médicale - Techniques usuelles. Elsevier Masson2007, 2^e Ed,Paris, 640 p.
- Martin C., Maugein J (2012).Bactériologie des mycobactéries responsables d'infections respiratoires. EMC - Pneumologie.9(2):1-15.

- Mathema B., Kurepina NE., Bifani PJ., Kreiswirth BN (2006). Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev. 19(4): 658-685.
- Matos F., Amado A., Botelho A (2010). Molecular typing of Mycobacterium bovis isolated in the first outbreak of bovine tuberculosis in the Azores Islands: a case report. Vet Med (Praha). 55(3):133-6.
- Matos F., Cunha MV., Canto A., Albuquerque T., Amado A., Botelho A (2010). Snapshot of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae infections in livestock in an area with a low incidence of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol.48(11):4337-9.
- Mekonnen GA., Mihret A., Tamiru M., Hailu E., Olani A., Aliy A., et al (2020). Genotype Diversity of Mycobacterium bovis and Pathology of Bovine Tuberculosis in Selected Emerging Dairy Regions of Ethiopia. Front Vet Sci.7:553940.
- Menzies FD., Neill SD(2000). Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. Vet J. 160 (2): 92–106.
- Metchock WRJ., Notte FS, Mycobacterium. Manual of clinical microbiology, 7th editio. Washington DC, 2001, pp. 399–437.
- Michel AL., Müller B., van Helden PD (2010).Mycobacteriumbovisat the animal–human interface: A problem, or not? Vet Microbiol. 140 (3-4): 371–381.
- MichelAL (2014). Improving specific disease outcomes through a One Health approach – tuberculosis.Rev sci tech Off int Epiz. 33 (2): 583-592.
- Miller M., Olea-Popelka F (2013). One Health in the shrinking world: Experiences with tuberculosis at the human–livestock–wildlife interface Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases xxx (2013) xxx– xxx.
- Mitscherlich E., Marth EH (1984). Microbial survival in the environment: bacteria and rickettsiae important in human and animal health.Springer Science and Business Media, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo 1984. Springer-Verlag, 803p.
- Monaghan ML., Doherty ML., Collins JD.,. Kazda JF.,Quinn PJ (1994).The tuberculin test.Vet Microbiol. 40 (1-2): 111-124.
- Müller B., Hilty M., Berg S., Garcia-Pelayo MC., Dale J., Boschirolu ML., et al (2009). African 1, an epidemiologically important clonal complex of Mycobacterium bovis dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. J Bacteriol. 191(6): 1951-1960.
- Müller B., Steiner B., Bonfoh B., Fané A., Smith NH., Zinsstag J (2008). Molecular characterisation of Mycobacterium bovis isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. BMC Vet Res.4:26.

- Murai K., Tizzani P., Awada L., Mur L., Mapitse NJ., Caceres P (2019). Tuberculose bovine : distribution mondiale et mise en œuvre des mesures de prévention et de lutte d'après les données de WAHIS. In PANORAMA 2019-1 bulletin, <https://oiebulletin.com/?panorama=3-01-tb-wahis-fr&lang=fr>.
- Olea-Popelka F., Muwonge A., Perera A., Dean AS., Mumford E., Erlacher-Vindel E., Forcella S., Silk BJ., Ditiu L., El Idrissi A., Raviglione M., Cosivi O., LoBue P., Fujiwara PI(2016). Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* —a call for action. *The Lancet Infectious Diseases*. 17(1): e21-e25.
- Oloya J., Muma JB., Opuda-Asibo J., Djonne B., Kazwala R., Skjerve E (2007) . Risk factors for herd-level bovine-tuberculosis seropositivity in transhumant cattle in Uganda. *Prev Vet Med*. 80(4): 318-329.
- O'Reilly LM., Daborn CJ (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis*. 76 Suppl 1:1-46.
- Paes AC (2010). Tuberculose bovina. In: Pires AV, editor. *Bovinocultura de corte*. Piracicaba: FEALQ, 993-1015.
- Palacios JJ., Navarro Y., Romero B., Penedo A., Gonzalez AM., Hernandez PMD et al (2016). Molecular and epidemiological population-based integrative analysis of human and animal *Mycobacterium bovis* infections in a low-prevalence setting. *Vet Microbiol*. 195: 30-36.
- Palisson A., Courcoul A., Durand B (2016). Role of Cattle Movements in Bovine Tuberculosis Spread in France between 2005 and 2014. *PLoS One*. 11(3): e0152578.
- Palmer MV (2013). *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound Emerg Dis*. 60 Suppl 1: 1-13.
- Panteix G., Gutierrez MC., Boschioli ML., Rouviere M., Plaidy A., Pressac D., et al (2010). Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *J Med Microbiol*. 59, 984–989.
- Parlane NA., Chen S., Jones GJ., Vordermeier HM., Wedlock DN., Rehm BHA., Buddle BM(2015). Display of antigens on polyester inclusions lowers the antigen concentration required for a bovine tuberculosis Skin Test. *Clin Vaccine Immunol*. 23(1): 19-26.
- Pepperell CS., Casto AM., Kitchen A., Granka JM., Cornejo OE., Holmes EC., Birren B., Galagan J., Feldman MW (2013). The Role of Selection in Shaping Diversity of Natural *M. tuberculosis* Populations. *PLOS Pathogens*. 9 (8):e1003543.

- Perez AM., Ward MP., Ritacco V (2011). Modelling the feasibility of bovine tuberculosis eradication in Argentina. *Rev scitechOffintEpiz.* 30 (2): 635-643.
- Pfyffer GE., Palicova F (2011). *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures In Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition, Ed ASM Press, Washington, 472-502 p.
- Pilet C., Bourdon JL., Toma B., Marchal N., Balbastre C (1979). *Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne*, Editeur : Doin, 2e éd, 437 p.
- Pollock JM., McNair J., Bassett H., Cassidy JP., Costello E., Aggerbeck H., Rosenkrands I., Andersen P (2003). Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol.* 41(5): 1856-1860.
- Pollock JM., Rodgers JD., Welsh MD., McNair J (2006). Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet Microbiol.* 112(2-4): 141-150.
- Pollock JM., Welsh MD., McNair J (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 108 (1-2): 37-43.
- Portaels F (1995). Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin Dermatol.* 13:207-22.
- Porvaznik I., Solovic I., Mokry J(2016). Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. *Adv Exp Med Biol.* 944: 19-25.
- Prodinger WM., Brandstätter A., Naumann L., Pacciarini M., Kubica T., Boschioli ML., et al (2005). Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol.* 43(10):4984-92.
- Pucken VB., Knubben-Schweizer G., Dopfer D., Groll A., Hafner-Marx A., Hormansdorfer S., Sauter-Louis C., Straubinger RK., Zimmermann P., Hartnack S (2017). Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS One.* 12(6): e0179847.
- Qin, QL., Xie BB., Zhang XY., Chen XL., Zhou BC., Zhou J., et al (2014). A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. *J Bacteriol.* 196: 2210–2215.
- Quadri NS., Brihn A., Shah JA., Kirsch JD (2021). Bovine tuberculosis: A re-emerging zoonotic infection. *J Agromedicine.* 26: 334–339.

- Rabinowitz PM., Natterson-HorowitzBJ., KahnLH., Kock R.,Pappaioanou M (2017). Incorporating one health into medical education. BMC Medical Education. 17:45.
- Rajwani R., Shehzad S., Siu GKH (2018). MIRU-profiler: a rapid tool for determination of 24-loci MIRU-VNTR profiles from assembled genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. Peer J. 11(6à):e5090.
- Ramos DF., Silva PEA., Dellagostin OA (2015). Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. Braz J Biol. 75(4): 830-837.
- Rani N., Tomar P., Kapoor PK., Mahajan NK., Jindal N., Chhabra R (2017).Historical Perspectives and Epidemiology of Bovine Tuberculosis.Int J Pure App Biosci. 5 (5): 1406-1414.
- Rastogi N., Legrand E., Sola C (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis.Rev Sci Tech.20 (1): 21-54.
- Ripoll F., PasekS., SchenowitzC., DossatC., BarbeV., RottmanM., et al (2009). Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. PLoS One 4(6): 1-12.
- Riviere J., Le Strat Y., Hendrikx P., Dufour B (2017).Cost-effectiveness evaluation of bovine tuberculosis surveillance in wildlife in France (Sylvatub system) using scenario trees. PLoS One. 12(8): e0183126.
- Rivière J., Le Strat Y., Hendrikx P., Dufour B (2017).Cost-effectiveness evaluation of bovine tuberculosis surveillance in wildlife in France (Sylvatub system) using scenario trees. PLoS ONE 12(8): e0183126.
- Robinson PA., Corner LAL., Courcier EA., McNair J., Artois M., Menzies FD., Abernethy DA (2012). BCG vaccination against tuberculosis in European badgers (*Meles meles*): a review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 35(4): 277-287.
- Rodriguez S., Bezos J., Romero B., de Juan L., Alvarez J., Castellanos E., et al. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. Emerg Infect Dis. 17(3):532-5.
- Rodriguez-Campos S., Navarro Y., Romero B., de Juan L., Bezos J., Mateos A., et al (2013). Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. J Clin Microbiol.51(11):3658-65.

- Rodriguez-Campos S., Smith NH., Boniotti MB., Aranaz A (2014). Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 97 Suppl: S5-S19.
- Rodriguez-Campos S., Smith NH., Boniotti MB., Aranaz A (2014). Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci.97:S5-S19.
- Rodriguez-Morales AJ., Castañeda-Hernández DM (2014). Bacteria: *Mycobacterium bovis* In book: Encyclopedia of Food Safety, Chapter: *Mycobacterium bovis*, Publisher: Academic Press, Editors: Motarjemi Y, Moy GG, Todd ECD, pp.468-475.
- Rossi G., De Leo GA., Pongolini S., Natalinid S., Vincenzi S., Bolzoni L (2015). Epidemiological modelling for the assessment of bovine tuberculosis surveillance in the dairy farm network in Emilia-Romagna (Italy). Epidemics. 11: 62–70.
- Ru H., Liu X., Lin C., Yang J., Chen F., Sun R., Zhang L., Liu J(2017). The impact of genome region of difference 4 (RD4) on mycobacterial virulence and BCG efficacy. Front Cell Infect Microbiol. 7: 239.
- Ruettger A., Nieter J., Skrypnik A., Engelmann I., Ziegler A., Moser I., et al (2012). Rapid spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by use of a microarray system with automatic data processing and assignment. J Clin Microbiol. 50(7):2492-5.
- Runyon EH (1959). Anonymous *Mycobacteria* in Pulmonary Disease. Med Clin North Am. 43(1): 273-290.
- Sahraoui N., Müller B., Djamel Y., Fadela B., Rachid O., Jakob Z., et al (2010). Evaluation des VNTR (variable number of tandem repeats) des isolats de *Mycobacterium bovis* en Algerie. Ann Biol Clin (Paris).68(4):449-53.
- Sahraoui N., Muller B., Guetarni D., Boulahbal F., Yala D., Ouzrout R., et al (2009). Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. BMC Vet Res. 5:4.
- Sandoval-Azuara SE., Muniz-Salazar R., Perea-Jacobo R., Robbe-Austerman, S., Perera-Ortiz A., Lopez-Valencia V et al(2017). Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* to obtain molecular fingerprints in human and cattle isolates from Baja California, Mexico. IJID. 63: 48-56.

- Santos N., Santos C., Valente T., Gortázar C., Almeida V., Correia-Neves M (2015). Widespread environmental contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex revealed by a molecular detection protocol. PLoS One. 10: e0142079.
- Schürch AC., van Soolingen D (2012). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. Infect Genet Evol.12(4): 602-609.
- SennaSG., Battilana J, Costa JC., Silva MG., Duarte RS.,Fonseca LS., Suffys PN., Bogo MR (2008). Sequencing of *hsp65* Gene for Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Environmental and Clinical Sources in Rio de Janeiro, Brazil.2008. J Clin Microbiol. 46(11): 3822-3825.
- Shinnick TM., Good RC (1994). Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 13 : 884–901.
- Shrikrishna D., de la Rua-Domenech R., Smith NH., Colloff A., Coutts I (2009). Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? Thorax. 64:89–91.
- Siala M., Cassan C., Smaoui S., Kammoun S., Marouane C., Godreuil S., et al (2019). A first insight into genetic diversity of *Mycobacterium bovis* isolated from extrapulmonary tuberculosis patients in South Tunisia assessed by spoligotyping and MIRU VNTR. PLoS Negl Trop Dis.13(9):e0007707.
- Skuce RA., McCorry TP., McCarroll JF., Roring SMM., Scott AN., Brittain D., et al (2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology (Reading).148(Pt 2):519-28.
- Smith NH (2012). The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. Infect Genet Evol. 12(4): 857-865.
- Smith NH (2012). The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. Infection Genetics and Evolution.12(4):857-65.
- Smith NH., Upton P (2012). Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; [www .Mbovis.org](http://www.Mbovis.org). Infect Genet Evol.12(4):873-6.
- Smith RMM., Drobniewski F., Gibson A., Montague JDE., Logan MN., Hunt D., Hewinson G., Salmon RL., O'Neill B (2004). *Mycobacterium bovis* Infection, United Kingdom. Emerg Infect Dis. 10 (3):539-541.

- Souza II., Melo ES., Ramos CA, Farias TA., Ar Osório AL., SG Jorge K,ES Vidal C, Silva AS., Silva MR., Pellegrin AO., Araújo FR (2012). Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. Springerplus. 1 (1):77.
- Steingart KR., Vivienne Ng., Henry M., Hopewell PC., Ramsay A., Cunningham J., Urbanczik R., Perkins MD., Abdel Aziz M., Pai M (2006). Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis. 6(10):664-74.
- Stinear TPT., Seemann PF., Harrison GA., Jenkin JK., Davies PDR., Johnson., et al (2010). Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Research.18 (1): 729-741.
- Stucki D., Gagneux S (2013). Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. Tuberculosis (Edinb). 93(1):30-39.
- Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez MC., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., van Soolingen D (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 44(12): 4498-4510.
- Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rusch-Gerdes S., Willery E., et al (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 44(12):4498-510.
- Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soolingen D., Locht C (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol. 39: 3563-3571.
- Tazerart F., Saad J., Niar A., Sahraoui N., Drancourt M (2021). *Mycobacterium bovis* Pulmonary Tuberculosis, Algeria. Emerg Infect Dis. 27(3):972-4.
- Thierry D., Brisson-Noël A., Vincent-Lévy-Frébault V., Nguyen S., Guesdon JL., Gicquel B(1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol. 28(12): 2668-2673.

- Thoen C., Lobue P., de Kantor I (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet Microbiol. 112(2-4) : 339-345.
- ThoenCO., KaplanB., ThoenTC., GilsdorfMJ., ShereJA(2016). Zoonotic Tuberculosis. A Comprehensive One HealthApproach. Medicina (Buenos Aires). 76: 159-165.
- Thorel MF., (2003). Tuberculose. In : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Lefèvre P-C., Blancou J., Chermette R, 2003. Editions TEC et DOC, Editions Médicales internationales EM, 2^{ème} édition, p 1761.
- Tortoli E (2019). Non tuberculous Mycobacteria (NTM) Microbiological, Clinical and Geographical Distribution, Chapter 1 - The Taxonomy of the Genus Mycobacterium, Pages 1-10.
- Tripathi K., Tripathi P., Nema S., Shrivastava A., Dwiwedi K., Dhanvijay A (2014). Modified Petroff's Method: an Excellent Simplified Decontamination Technique in Comparison with Petroff's Method. International Journal of Recent Trends in Science And Technology.10(3):461-4.
- Van Ingen J (2013). Diagnosis of non tuberculous mycobacterial infections. Semin. Respir. Crit. Care Med. 34: 103–109.
- Van Soolingen D., Hermans PWM., De Haas PEW., Soll DR., van Embden JDA(1991).Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains: evaluation of an insertionsequence-dependent DNA polymorphism as atool in the epidemiology of tuberculosis.J Clin Microbiol.29(11) : 2578-2586.
- Vasconcellos SE., Huard RC., Niemann S., Kremer K., Santos AR., Suffys PN., Ho JL (2010). Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*. BMC Infect Dis.10: 80.
- Verma AK., Tiwari R., Chakraborty S., Neha , Saminathan M., Dhama K., Singh SV (2014). Insights into bovine tuberculosis (bTB), various approaches for its diagnosis, control and its public health concerns: An update. Asian J Anim Vet Adv. 9(6): 323-344.
- Veziris N., Aubry A., Sougakoff W., Truffot-Pernot C., Jarlier V(2004). Place des outils moléculaires dans le diagnostic, le traitement et l'épidémiologie des infections à mycobactéries.Med Trop. 64 : 243-250.
- Viale MN., Zumárraga MJ., Araújo FR., Zarraga AM., Cataldi AA., Romano MI., Bigi F (2016). The genomics of mycobacteria. Rev Sci Tech. 35(1): 215-240.

- Vincent V (1995). Taxonomie des mycobactéries. Revue française des laboratoires.273: 27-31.
- Von Groll, A., Martin, A., Felix, C., Prata, PFS., Honscha, G., Portaels, F., ... Palomino, JC. (2010). Fitness study of the RDRio lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 58(1), 119-127.
- Voskuil MI., Schnappinger D., Rutherford R., Liu Y., Schoolnik GK(2004). Regulation of the *Mycobacteriumtuberculosis* PE/PPE genes. *Tuberculosis (Edinb)*.84(3-4): 256-262.
- Wagari A (2016). Review on Diagnostic Techniques of Bovine Tuberculosis. *Int J Biochem*. 1(1): 11-17.
- Wallace RJ., Glassroth J., Griffith DE., Olivier KN., Cook JL.,Gordin F (1997). Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 156 : S1–S25.
- Waters WR., Vordermeier HM., Rhodes S., Khatri B., Palmer MV., Maggioli MF., et al(2017). Potential for rapidantibody detection to identify tuberculous cattle with non-reactive tuberculin skin test results. *BMC Vet Res*. 13(1): 164.
- Wedlock DN., Skinner MA., de Lisle GW., Buddle BM (2002). Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect*. 4 (4): 471-480.
- Wedlock DN., Skinner MA., de LisleGW., Buddle BM (2002). Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect*. 4:471–480.
- Wood PR., Corner LA., Plackett P (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ interferon. *Res Vet Sci*. 49(1): 46-49.
- Wood PR., Jones SL (2001). BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 81(1-2): 147-155.
- World Organization for Animal Health (OIE). Bovine Tuberculosis. 2018. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE-TB-EN.pdf [Accessed: September 18, 2018].
- Yahyaoui-Azami H., Aboukhassib H., Bouslikhane M., Berrada J., Rami S., Reinhard M., et al (2017). Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco. *Bmc Veterinary Research*.13.

- Yang L., Wang C., Wang H., Meng Q., Wang Q (2015). Evaluation of MIRU-VNTR for typing of *Mycobacterium bovis* isolated from Sika deer in Northeast China. BMC Vet Res. 11:93.

Annexes

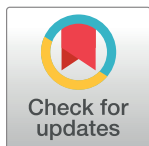
RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the discriminatory power of spoligotyping and 19-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat analysis (MIRU-VNTR) of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle in Algeria

Faïza Belakehal^{1*}, Stefanie A. Barth^{2,3*}, Christian Menge², Hamdi T. Mossadak¹, Naïm Malek⁴, Irmgard Moser^{2,3}

1 High National Veterinary School, Laboratory of Food Hygiene and Quality Insurance System, El-Alia, Oued Smar, Algeria, **2** Friedrich-Loeffler-Institut/Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis, Germany, **3** National Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, at Friedrich-Loeffler-Institut/Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis, Germany, **4** Central Military Hospital, Department of Microbiology, Kouba, Algeria

* faiza.belakehal@gmail.com (FB); stefanie.barth@fli.de (SAB)



OPEN ACCESS

Citation: Belakehal F, Barth SA, Menge C, Mossadak HT, Malek N, Moser I (2022) Evaluation of the discriminatory power of spoligotyping and 19-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat analysis (MIRU-VNTR) of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle in Algeria. PLoS ONE 17(1): e0262390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262390>

Editor: Igor Mokrousov, St Petersburg Pasteur Institute, RUSSIAN FEDERATION

Received: August 16, 2021

Accepted: December 23, 2021

Published: January 11, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262390>

Copyright: © 2022 Belakehal et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Bovine tuberculosis (bTB) caused by *Mycobacterium (M.) bovis* and *M. caprae* is a transmissible disease of livestock, notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE). BTB particularly affects cattle and small ruminants and can be transmitted to humans thereby posing a significant threat to veterinary and public health worldwide. *M. bovis* is the principal cause of bTB in Algeria. In order to better understand the route of spreading and elaborate an eradication program, isolation and characterization of mycobacteria from Algerian cattle was performed. Sixty strains belonging to the *M. tuberculosis* complex were analyzed by spoligotyping, thereof 42 by 19-locus-MIRU-VNTR-typing. Spoligotyping revealed 16 distinguishable patterns (Hunter-Gaston discriminatory index [HGDI] of 0.8294), with types SB0120 (n = 20) and SB0121 (n = 13) being the most frequent patterns, representing 55% of the strains. Analyses based on 19-locus-MIRU-VNTR yielded 32 different profiles, five clusters and one orphan pattern, showing higher discriminatory power (HGDI = 0.9779) than spoligotyping. Seven VNTR-loci [VNTR 577 (alias ETR C), 2163b (QU11b), 2165 (ETR A), 2461 (ETR B), 3007 (MIRU 27), 2163a (QUB11a) and 3232 (QUB 3232)] were the most discriminative loci (HGDI > 0.50). In conclusion, 19-locus-MIRU-VNTR yielded more information than spoligotyping concerning molecular differentiation of strains and better supports the elucidation of transmission routes of *M. bovis* between Algerian cattle herds.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and the [supporting information](#).

Funding: Parts of this work were funded by a travel and stay grant from the High National Veterinary School, Algeria, (ENSV, www.ensv.dz) (grant no. 000592) for Faiza Belakehal. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) represents a veterinary and public health threat of global relevance. Despite the importance of the disease, there is no official data concerning the true prevalence of bTB in many low and middle-income countries. This also holds for Algeria, despite the fact that bTB is a notifiable animal disease [1]. Although multiple disease control plans are implemented by the Algerian official's health services, there are still many obstacles to control and eradicate bTB. Skin test and meat inspection at slaughter represent the main methods in bTB surveillance. Application of culture and molecular diagnostic methods is extremely limited in low-income countries due to high costs and time requirements [2]. Several strategies assessing cost effectiveness and socio-economic factors have been proposed to fight bTB [3]. In Algeria, we suspect that most bTB-infected herds are geographically clustered in the north-east of the country because of the high concentration of cattle compared to other areas. It is assumed that transmission of bTB in Algeria is mainly attributed to cattle movement, although a study conducted in France by Palisson [4] disclosed the key role played by the spatial neighborhood of infected herds. Genotyping tools are crucial for unveiling pathogen transmission routes in bTB and tracing back sources of infections. The DR region (direct repeat) analyzed by spoligotyping is a unique region (locus) which contains well-conserved 36 bp direct repeats separated by variable sequences from 35 to 41 bp. These sequences vary from one strain to another by their length, their sequence and their number. The differentiation of the strains is based on the variability of the number of DRs and on the presence or absence of the particular spacers [5]. Because of its simplicity, its binary result format and its high reproducibility, spoligotyping is widely used for the molecular epidemiology of members of the *M. tuberculosis* complex [6]. However, this method is less resolving than either VNTR typing or restriction enzyme analysis, limiting its usefulness in forensic investigations [7]. The VNTR loci containing a variable number of tandem repeats are amplified by PCR using specific primers and the size of the product is determined by gel electrophoresis. The MIRU-VNTR technique is faster than restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, easy to interpret, more reproducible between laboratories [8] and gives a higher degree of discrimination than spoligotyping [9]. Spoligotyping [5, 10] and mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR) analyses were used [11], since the combination of these two genetic markers is known to be a powerful tool to study the molecular epidemiology in a *M. bovis* population [12]. The main goal of the present study was molecular typing of the Algerian *M. bovis* population in order to improve our understanding of disease epidemiology and bTB spread in Algeria.

Materials and methods

Bacterial strains and molecular identification

A total of 3,848 cattle were inspected for bTB at four slaughterhouses in the north part of Algeria (Dellys, El Harrach, Hadjout and Hussein Dey) between January and May 2017. The origin of the animals could not be determined due to the lack of an efficient livestock identification system in Algeria. The most important target organs for tuberculosis lesions, i.e. the respiratory tract (lung tissue and lymph nodes), the thoracic cavity, retropharyngeal lymph nodes, liver and kidney, were inspected at slaughter. Tissue samples were taken during inspection of carcasses for the presence of visible lesions suspected of tuberculosis. The cut surfaces of lymph node were examined carefully for the presence of abscess, caseous mass and tubercles. Out of 3,848 animals screened, 184 carcasses presented with lesions suspicious of bTB and samples from single organs of 105 animals were submitted for microbiological examination.

Organs predominantly affected were respiratory tract and lymph nodes. The tissue samples were decontaminated according to the modified Petroff's method [13, 14]. Briefly, 5 ml of NaOH solution (4%) were added to about 10 g of tissue, minced by a mortar in 4 ml of sterile distilled water, and incubated for 15 min. The suspension was diluted by 10 ml of sterile distilled water and then centrifuged at 3000 x g for 20 min. The pellet was used as an inoculum to solid Löwenstein-Jensen medium. Mycobacteria were cultured at Pasteur Institute of Algiers (IPA), Reference Laboratory for Tuberculosis and Mycobacteria for six to eight weeks according to standard protocols.

The molecular characterization of isolates was performed at the National Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis at the Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, Germany. Using bacterial DNA extracted by the thermal lysis method described by Berg et al. [15], strains were identified as members of the *M. tuberculosis* complex using the RD9 PCR. The PCR was performed using oligonucleotide primers for detection of the RD9 deletion. A PCR reaction mix consisted of 0.5 µl of each primer (100 µM), 0.2 µl of Taq polymerase (Taq PCR Core Kit, Qiagen, Germany), 2 µl 10x PCR buffer, 4 µl of Q solution, 0.4 µl of 0.25 mM MgCl₂, 0.4 µl dNTPs (10 mM each) and 1 µl of purified DNA in a final volume of 20 µl. PCR amplification program included one denaturation step (15 min, 96°C) followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C. PCR amplification products were separated in 1.5% agarose gel after electrophoresis at 110 V for 1 h and visualized using ethidium bromide under UV light. *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* H37Rv strains served as positive controls.

Molecular typing

Spoligotyping was performed using the DNA microarray format of the ArrayStrip platform (Alere Technologies GmbH [now Abbott], Jena, Germany) according to the manufacturer's instructions as described by Ruettger et al. [10]. Briefly, after DNA extraction with the thermal lysis method, DR regions were amplified using 5-biotinylated primers DRa/DRb [5], and then allowed to hybridize on the microarray (hybridization at 60°C, wash steps at 55°C). Finally, arrays were scanned and analyzed by the ArrayMate™. The Alere Technologies software measures the signal intensity of each probe and compares the profiles automatically to those available at the *M. bovis* Spoligotype Database (www.mbovis.org [16]) and the SITVIT1 database (www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/index.jsp [17]).

MIRU-VNTR typing of the *M. bovis* strains was carried out using in-house technique [18], according to Supply et al. [11] with slight modifications, as for VNTR locus 2461-PCR the primers described by Frothingham et al. [19] and for VNTR locus 2163a-PCR the primers of Skuce et al. [20] were used. DNA was purified using the High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Life Science (USA). The PCRs were performed using 0.8 µl of each primer (20 µM; MWG Eurofins, Germany), 0.1 µl of Taq polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen, Germany), 2 µl 10x PCR buffer, 4 µl 5x Q solution, 0.4 µl 0.25 mM MgCl₂, 0.8 µl dNTPs (10 mM each) and 1 µl of purified DNA in a final volume of 20 µl. PCR amplification program included one denaturation step (15 min, 95°C) followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 59°C and 120 s at 72°C. The PCR for VNTR locus 2163a differed with a 25 µl reaction mix (0.5 µl of each primer, 0.1 µl of Hotstar Taq polymerase, 2.5 µl 10x PCR buffer, 1.25 µl 5x Q solution, 0.5 µl dNTPs and 2 µl of purified DNA) and an annealing temperature of 55°C during amplification [20]. PCR amplification products were separated in 1.5% agarose gels after electrophoresis at 100 V for 2 h 15 min and visualized using ethidium bromide under UV light.

Allelic diversity estimations were calculated using the Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) [21]. The HGDI was used to determine the allelic diversity within each MIRU-VNTR

locus and the genotypic diversities (discriminatory power) of the spoligotyping assays, the 19-locus MIRU-VNTR and the combination of both methodologies, using the website application <http://insilico.ehu.es/>. The sample profiles were analyzed by BioNumerics (version 7.6.2, Applied Maths, The Netherlands) to assess the overall genetic similarity of the strains.

Results and discussion

Bacterial strains and molecular identification

Out of 105 samples submitted to microbiological examination, 60 samples showed bacterial growth on Löwenstein-Jensen medium. With a first screening by analysis for acid-fast bacteria, all 60 samples yielded a positive signal and were subsequently subjected to DNA extraction. Subsequent RD9 PCR showed that all 60 strains belonged to *M. tuberculosis* complex whereas non-tuberculous mycobacteria were not isolated.

Spoligotyping

Of the 60 *M. tuberculosis* complex strains, 59 were identified as *M. bovis* by spoligotyping and one as *M. caprae* (S1 Table). Among the 60 strains, 16 different spoligotypes were identified (Table 1). Four new spoligotypes have been found in the present study and were subsequently submitted to the *M. bovis* spoligotype database (www.mbovis.org). Those new spoligotypes received the ID numbers SB2520 (n = 1), SB2521 (n = 5), SB2522 (n = 1), and SB2523 (n = 1). Two of the four new spoligotypes, SB2520 and SB2521, have been described recently in Algerian cattle and human samples respectively [22].

The predominant spoligotypes found were SB0120 (n = 20) and SB0121 (n = 13), both belonging to the family BOV_1 and differing in only one spacer (no. 21), followed by SB0134 (n = 7), SB2521 (n = 5), and SB0828 (n = 2). The most prevalent spoligotypes SB0120, SB0121,

Table 1. Spoligotype patterns of 59 *M. bovis* and one *M. caprae* strains and their relative frequencies.

SB No.	Spoligotype		No. of strains	Frequency [%]	SIT	Family
	binary code	octal code				
SB0120	11011111011111101111111111111111100000	67677377777600	20	33.3	482	BOV_1
SB0121	11011111011111101111111111111111100000	67677367777600	13	21.7	481	BOV_1
SB0134	11000110111110111111111111111111100000	61677377777600	7	11.7	665	BOV_1
SB2521	11000110111110111011111111111111100000	61677357777600	5	8.3	n.k.	n.k.
SB0339	11011111011111101111101111000011111111100000	676773674177600	2	3.3	696	BOV_1
SB0828	1101111101111110111111111111111110111100000	676773777773600	2	3.3	1047	BOV_1
SB1542	110001110001111011111111111111111111100000	61617377777600	2	3.3	n.k.	BOV
SB0119	1101111101111100111101111111111111111100000	67676367777600	1	1.7	695	BOV
SB0818	11011111011111101111111111111111101111100000	676773777767600	1	1.7	1044	BOV_1
SB0822	1100111101111110111111111111111111111100000	63677377777600	1	1.7	997	BOV_1
SB0848	11011111011101101111101111111111111111100000	67673367777600	1	1.7	1010	BOV_1
SB1452	11011110001111001111011111111111111111100000	67436367777600	1	1.7	1595	BOV
SB2520	11000110111111101111111111111011111111100000	616773777377600	1	1.7	n.k.	n.k.
SB2522	11011111011111101111110011111111111111100000	676773717757600	1	1.7	n.k.	n.k.
SB2523	11011111011111101001111111111111111111100000	67677237777600	1	1.7	n.k.	n.k.
SB0835	01000000000000001111111111101110111111100000	200003777357600	1	1.7	978	BOV_4 Caprae
Total			60	100		

n.k.: not known; **SIT:** spoligo-international type according to the SITVIT1 nomenclature; **BOV:** Bovine.

The binary code is represented by 43 digits. The number 0 indicate the absence of signal and the number 1 indicate the presence of signal.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262390.t001>

and SB0134 were already detected by a study conducted 10 years earlier in Algeria [23]. Of note, the two new types SB2522 and SB2523 as well as three additional spoligotypes, namely SB0119 (n = 1), SB0848 (n = 1), and SB1542 (n = 2) have not been reported in Algeria before.

Presence of spoligotypes SB0121, SB0120, and SB0134 was also reported for the neighboring countries Morocco and Tunisia as well as France [24–26]. Interestingly, the second most frequently found spoligotype in Morocco, type SB0265, was not detected in our study in Algerian cattle although in silico analysis of whole genome sequence (WGS) data from four Algerian human *M. bovis* isolates [27] could assign two of the strains to SB0265 implying that the spoligotype is present in Algeria, too. The BCG cluster associated spoligotypes SB0120 and SB0121 are circulating nearly worldwide in Europe, Africa, and America [28, 29]. Spoligotype SB0134 is also frequent in many African countries (e.g., Tunisia, Morocco, Mali and Ethiopia) [30–33]. The new type SB2520 identified in our study has been recently found in Ethiopia [33]. The spoligotypes SB0339 and SB0119 are common on the Iberian peninsula, thereof SB0339 frequently reported for Spain and SB0119 in Portugal, and both were also reported for Morocco [24, 34, 35]. The spoligotype SB0818 has been reported in Italy [36] and France [26, 37], SB0848 in the neighboring country Tunisia [31] and in Portugal [38]. According to the database www.mbovis.org, spoligotype SB1542 was previously detected in Italy and *M. caprae* SB0835 in France. *M. caprae* has been identified mainly in continental Europe in the alpine region [39] and Spain [40]. In the study presented here only one *M. caprae* isolate with the spoligotype SB0835 was detected. Only few data exist on the detection of *M. caprae* in Africa. In Algeria two isolates of spoligotypes SB1451 and SB0835 were described before [22, 23], pointing to a rare occurrence of *M. caprae* in this country.

Nowadays, the composition of the spoligotypes in North Africa (Morocco, Algeria, Tunisia) is dominated by spoligotypes SB120, SB121 and SB0134 possibly having evolved from common ancestral strains introduced since decades from Europe [23–25]. Indeed, this can be explained by recent imports, given the incomplete eradication of bTB in Europe. France represents the country from which the majority of cattle in Algeria were imported. According to WAHIS interface, France is declared “officially tuberculosis free” (OTF) by the EU but bTB still exists and single outbreaks are repeatedly reported for cattle herds and wildlife in some areas of the country. Thereby, SB0120, SB121 and SB0134 are the major spoligotypes distributed in animals in France, too [26]. Moreover, a study conducted in Tunisia by Siala and colleagues analysed human *M. bovis* isolates and found 13 different spoligotypes, thereof, SB0120 and SB0121 as the dominating types [41].

MIRU-VNTR typing

Out of 60 strains of this study, VNTR profiles could be generated for 42 *M. bovis* strains. Missing success in the remaining cases might have been due to low DNA quality or quantity. A panel of 19 loci was chosen for conducting the MIRU-VNTR (Table 2).

Evaluated loci were selected according to the 12-locus panel proposed in the MIRU-VNTR plus web site (www.miru-vntrplus.org) in combination with the panel proposed by the European Reference Center for Bovine Tuberculosis (EU-RL bTB, VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid) for the molecular typing of *M. bovis* in Europe. Among them, the ETR loci (VNTR580, 2165, 2461, and 3192) had been evaluated by Sahraoui et al. [42] for Algerian strains previously. Additionally, the QUB loci (VNTR2163a, 2163b, 3232, and 4052) and VNTR2996 were included as these are regarded highly discriminative for *M. bovis* strains.

Overall, seven loci (VNTR577, 2163a, 2163b, 2165, 2461, 3007, and 3232) presented a high discriminatory power (HGDI > 0.50, Table 2). Our findings corroborate earlier data obtained

Table 2. Allele diversity of the 19-locus MIRU-VNTR in 42 Algerian *M. bovis* strains.

Locus		Number of strains with the respective number of copies													Allele diversity (HGDI)
VNTR	Alias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12–15	16	
2165	ETR-A	0	0	1	7	11	15	8	0	0	0	0	0	0	0.7573
3232	QUB3232	0	0	2	1	0	17	13	8	1	0	0	0	0	0.7178
2163a	QUB11a	2	0	0	0	1	0	0	0	15	17	5	0	1	0.6927
2163b	QUB11b	0	16	8	16	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0.6887
2461	ETR-B	0	0	1	20	19	2	0	0	0	0	0	0	0	0.5796
3007	MIRU27	3	17	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5703
577	ETR-C	1	1	13	2	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5598
4052	QUB26	3	1	2	5	30	1	0	0	0	0	0	0	0	0.4785
3192	MIRU31/ETR-E	0	3	33	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3659
580	MIRU04/ETR-D	2	0	38	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.1823
2687	MIRU24	2	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0929
154	MIRU02	1	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0476
802	MIRU40	1	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0476
2059	MIRU20	1	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0476
2996	MIRU26	0	0	0	1	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0476
4348	MIRU39	0	41	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0476
960	MIRU10	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1644	MIRU16	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2531	MIRU23	0	0	0	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ETR: Exact Tandem Repeat; MIRU: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit; QUB: Queen's University Belfast.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262390.t002>

in Tunisia [25] which showed a high resolution of VNTR2163a, 2163b, 2461, 2165, and 3232, while the four loci VNTR577, 2165, 2461, and 3007, showed a high discriminatory power for Algerian strains also in previous data sets [42]. Furthermore, this is consistent with data reported for *M. bovis* strains from Mexico and Germany [43, 44]. Rodriguez-Campos et al. [45] found only a very low allele diversity for locus VNTR2163b (HGDI = 0.08), but analyzed only SB0121 strains. The two loci VNTR3192 and 4052 showed moderate allelic diversity (HGDI = 0.36 and HGDI = 0.47, respectively) and locus VNTR580 a low allelic diversity (HGDI = 0.18). Very low allele diversity (HGDI <0.15) was observed for six loci (VNTR154, 802, 2059, 2687, 2996, and 4348). By contrast, Yang et al. [46], found a high allele diversity in the loci VNTR580 (HGDI = 0.607) and 802 (HGDI = 0.495) but no resolution for loci VNTR2059, 2687 and 2996. This difference may be related especially to the geographic region from which the strains have been isolated, as we analyzed exclusively bovine strains from Algeria whereas Yang et al. typed strains from Sika deer in Northern China [46]. Finally, there is a difference in the resolution of loci between *M. tuberculosis* complex species. For example, loci VNTR960 and 2531 are reported very discriminatory for *M. tuberculosis* [47], but performed less well for *M. bovis* in the present study. VNTR2996 demonstrates a very low allele diversity in the present study (HGDI = 0.047). A possible explanation could be, that the number of strains analyzed in the present study was smaller and therefore less variance found. No allele diversity (HGDI = 0) was observed with the loci VNTR960, 1644, and 2531 which suggests that these loci are not suitable for typing Algerian *M. bovis* strains. Overall, analysis of 19-locus MIRU-VNTR in 42 strains revealed 32 different profiles among which 27 were found only in a single strain (Table 3).

The combination of MIRU-VNTR allele diversity and spoligotyping pattern demonstrated a large genotypic variety resulting in 33 profiles (Fig 1). Thereby spoligotypes were typed in

Table 3. Comparison of the discriminatory power of spoligotyping, 19-locus MIRU-VNTR typing and the combination of both methods.

Variability	Spoligotyping	MIRU-VNTR	Spoligotyping and MIRU-VNTR
No. of strains included	60	42	42
Total number of profiles (n)	16	32	33
Number of individual profiles (n)	9	27	28
Discriminatory index (HGDI)	0.8294	0.9779	0.9826

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262390.t003>

sub-profiles, e.g. SB0120 in 13 sub-profiles, SB0121 in five, and SB0134 in five, reflecting the heterogeneity of strains causing bTB in Algeria.

Scientific literature describes several routes of transmission of animal tuberculosis [48, 49]. The emergence of tuberculosis in wildlife [50] may constitute a continuous source for reinfection of cattle and could be at the origin of the persistence of bTB worldwide. This particularly

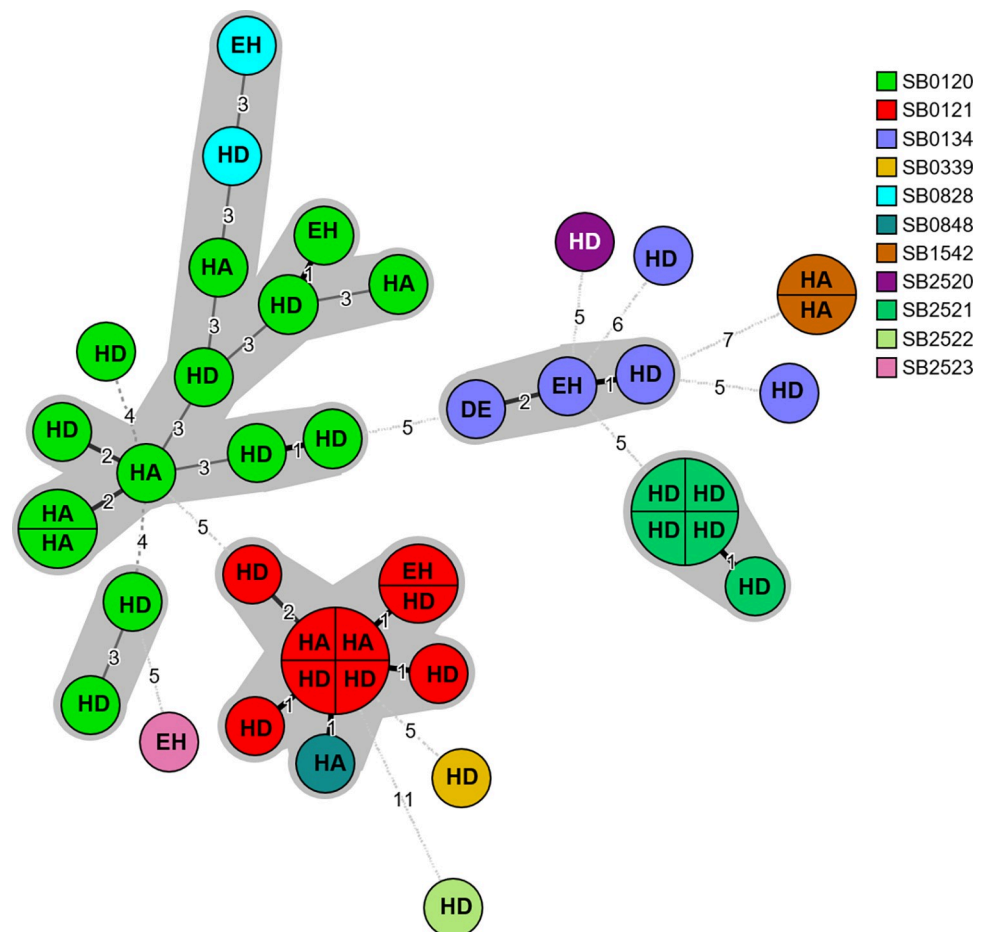


Fig 1. Minimum-spanning-tree based on the combination of spoligotyping and MIRU-VNTR results of 42 *M. bovis* strains isolated from slaughtered cattle in Algeria. Each node represents a unique spoligotype-VNTR sub-profile. If more than one strain exhibited the identical profile the node is separated. Nodes closer than three differences are put into one cluster (gray background). The number of differing alleles (repeat number of MIRU-VNTR and absence/presence of spacer for spoligotyping) between two nodes is indicated by the respective number. The letter inside the nodes represent the slaughterhouse the strains came from (HD: Hussein Dey, HA: Hadjout, EH: El Harrach, DE: Dellys) (BioNumerics, version 7.6.2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262390.g001>

holds for wild boar, which represent a new threat for livestock animals and agriculture in Algeria. Hence, the pathway of transmission of this pathogen in Algeria including wildlife needs to be studied. El Mrini et al. [51] described cases of tuberculosis due to *M. bovis* in Eurasian wild boar in Morocco. Without neglecting the role of re-infections within single cattle herds, mycobacteria may survive decades unrecognized in several biological niches due to the chronic sub-clinical course of infection, leading to persisting bTB in Algerian livestock. On the other hand, all our *M. bovis* strains were recovered from lungs and associated lymph nodes, suggesting a primarily airborne transmission of bTB to the cattle under study here and, consequently, an intimate contact between the respective animals. Indeed, combination of MIRU-VNTR allele diversity and spoligotyping pattern allowed us to unveil some possible epidemiological links. Constructing a minimum-spanning-tree revealed five clusters (spoligotype and MIRU-VNTR profile differing in 3 alleles in maximum) with the largest one comprising of 14 strains. Two sub-profiles (one in the SB0121 cluster and the other in the SB2521 cluster) contained four strains, that were identical in their spoligotype and MIRU-VNTR profiles, two additional sub-profiles were represented by two strains each. The four strains of the SB2521 sub-profile were all isolated at the slaughterhouse Hussein Dey. It is tempting to assume that cross-infection occurred between animals within one herd or the same area. In contrast, both sub-profiles with four and two strains, respectively, within the spoligotype SB0121 contained strains probably from different areas in Algeria as the strains were isolated from cattle slaughtered in different abattoirs. This includes the slaughterhouses of Hussein Dey and Hadjout which are 88 km distant from each other (source of the strains belonging to the four strain sub-profile), as well as slaughterhouses in El Harrach and Hussein Dey which are more proximate to each other. As we consider it unlikely that one owner had delivered his cattle to different slaughterhouses, the occurrence of identical spoligotype/MIRU-VNTR profiles in different geographical areas might be explained by the trade of animals between herds in those areas. In two cluster, two different spoligotypes (SB0848 and SB0121 as well as SB0828 and SB0120) are combined. Both pairs differ from each other only in one spacer (no. 13 is missing in SB0848 compared to SB0121 as well as no. 34 is missing in SB0828 compared to SB0120) it might be possible that spoligotypes SB0828 and SB0848 may have originated from spoligotype SB0120 and SB0121, respectively, by undergoing a genetic mutation on spacer 13 respectively 34. The singular SB0848 strain and four SB0121 strains possess identical MIRU-VNTR profiles, supporting the close relatedness of both spoligotypes.

Beyond disclosing recent transmission events and microevolution of *M. bovis* strains, genotyping of bacteria also may allow for a reconstruction of phylogeography and evolutionary history of these pathogens [52]. Spoligotyping in combination with other genomic markers, such as deletions [52, 53] and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been used to construct a phylogeography for *M. bovis* strains. The clonal complexes named “African 1” (Af1, characterized by missing of spacer 30) and “African 2” (Af2, missing spacers 3–7) were described as geographically localized in Central-West and East Africa, respectively. The cluster “European 1” (Eu1, missing spacer 11) is found mainly on the British Islands, in New Zealand, Australia, South Africa, and Korea and “European 2” (Eu2, missing spacer 21) on the Iberian peninsula and Western Europe [52–54]. Additional to those four ‘classical’ phylogenetic lineages recently eight new clonal lineages were defined on the basis of WGS data of more than 3,300 *M. bovis* isolates and spoligotypes where affiliated to certain phylogenetic lines [52]. Six out of the 16 spoligotypes detected in our study are also mentioned in this recent publication. The discriminatory capacity of spoligotyping is limited since diversity is measured at a single locus prone to convergent evolution and phylogenetic distances cannot be reliably inferred [55]. Despite this limitation our findings might point towards the phylogenetic positions of strains and indicate the multiplicity of clonal lines circulating in Algeria. The signature profile of the *M. bovis* BCG

vaccine strain is the absence of spacers 3, 9, 16, and 39 to 43 [29]. The BCG cluster is divided into two groups: the BCG-like group, represented by SB0121, and the ancestor BCG-like SB0120. In the present study, all *M. bovis* strains lacked spacers 3, 9, 16, and 39 to 43 and were therefore grouped to the BCG cluster (Table 1). On the African continent, the ancestral BCG-like cluster is predominantly found in Algeria, Zambia [56], and Mozambique [57]. The cluster Af1, Af2, and Eu1 have not been found in cattle outside of the previous mentioned regions [53]. Further studies, implicating WGS technology, will be required to determine if or to what extent the current bTB epizootic in Algeria originates from the long-term evolution during which animal-adapted *M. tuberculosis* complex, i.e. *M. caprae* and *M. bovis*, might have originally come out of Africa [58] or on a more recent (re)introduction of *M. bovis* from Europe as discussed above.

Conclusion

Until now, tuberculosis still represents a serious burden in Algeria for both, humans and animals. The BCG cluster derived spoligotypes (SB0120, SB0121) are the most frequent types circulating in Algeria and also worldwide. The analysis of four MIRU-VNTR loci [ETR A, VNTR2163b (QUB11b), 2163a (QUB11a), and 3232 (QUB3232)] would be sufficient to characterize Algerian *M. bovis* strains deeply. Nevertheless, the combination of MIRU-VNTR and spoligotyping is highly advisable. The association of those two techniques demonstrates the heterogenic population of Algerian *M. bovis* strains, indicating that different strains are responsible for bTB in Algeria. However, the lack of information concerning the origin of cattle (herd, country) currently impairs the unveiling of transmission routes of bTB in Algeria and must be implemented as part of the control program for the eradication of bovine tuberculosis in Algeria.

Supporting information

S1 Table. Spoligotyping pattern and MIRU-VNTR profile of 59 *Mycobacterium bovis* and 1 *Mycobacterium caprae* strain from cattle in Algeria. Abbreviations: nt, not tested; neg, no PCR fragment detectable.
(XLSX)

Acknowledgments

The author's address special thanks to the technicians Uta Brommer and Josefine Bach at FLI, Jena, Germany, for their excellent support to perform the molecular methods. We are grateful to Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter for providing the opportunity to perform the practical part of this work at the FLI, Jena, Germany.

Author Contributions

Conceptualization: Faïza Belakehal, Hamdi T. Mossadak, Naïm Malek, Irmgard Moser.

Data curation: Stefanie A. Barth.

Formal analysis: Faïza Belakehal, Stefanie A. Barth.

Investigation: Faïza Belakehal.

Methodology: Stefanie A. Barth, Irmgard Moser.

Supervision: Stefanie A. Barth, Hamdi T. Mossadak.

Visualization: Stefanie A. Barth.

Writing – original draft: Faïza Belakehal.

Writing – review & editing: Faïza Belakehal, Stefanie A. Barth, Christian Menge, Irmgard Moser.

References

1. Journal Officiel de la Republique Algerienne (JORA) N°16. Decret exécutif n°06–118 du 12 Safar 1427 correspondant au 12 Mars 2006 complétant le décret exécutif n°88–252 du 31 Décembre 1988 fixant les conditions d'exercice à titre privé des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux. 2006-03-15.
2. Asebe G. Molecular Characterization of Mycobacterium bovis and its Significance: Role for Control of Zoonotic Tuberculosis in Africa. *Journal of Medical Diagnostic Methods*. 2017; 06(03):250. <https://doi.org/10.4172/2168-9784.1000250>
3. Riviere J, Le Strat Y, Hendrikx P, Dufour B. Cost-effectiveness evaluation of bovine tuberculosis surveillance in wildlife in France (Sylvatub system) using scenario trees. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0183126. Epub 2017/08/12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183126> PMID: 28800642.
4. Palisson A, Courcoul A, Durand B. Role of Cattle Movements in Bovine Tuberculosis Spread in France between 2005 and 2014. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0152578. Epub 2016/03/29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152578> PMID: 27019291.
5. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(4):907–14. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997> PMID: 9157152.
6. Couvin D, Rastogi N. La mise en place de bases de données des génotypes circulants du complexe Mycobacterium tuberculosis et des outils web permettant de mieux surveiller, comprendre et contrôler l'épidémie de la tuberculose dans le monde. 2014; 2014(12):pp. 40–53.
7. Kao RR, Price-Carter M, Robbe-Austerman S. Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission. *Rev Sci Tech*. 2016; 35(1):241–58. Epub 2016/05/25. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2430> PMID: 27217181.
8. Duignan A, Good M, More SJ. Quality control in the national bovine tuberculosis eradication programme in Ireland. *Rev Sci Tech*. 2012; 31(3):845–60. Epub 2013/03/26. <https://doi.org/10.20506/rst.31.3.2166> PMID: 23520738.
9. Durr PA, Hewinson RG, Clifton-Hadley RS. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. Mycobacterium bovis genotyping. *Rev Sci Tech*. 2000; 19(3):675–88. Epub 2000/01/11. <https://doi.org/10.20506/rst.19.3.1241> PMID: 11107611.
10. Ruettger A, Nietzer J, Skrypnik A, Engelmann I, Ziegler A, Moser I, et al. Rapid spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria by use of a microarray system with automatic data processing and assignment. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(7):2492–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.00442-12> PMID: 22553239.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(12):4498–510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06> PMID: 17005759.
12. Marianelli C, Amato B, Boniotti MB, Vitale M, Pruiti Ciarello F, Pacciarini ML, et al. Genotype diversity and distribution of Mycobacterium bovis from livestock in a small, high-risk area in northeastern Sicily, Italy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(7):e0007546. Epub 2019/07/16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007546> PMID: 31306431.
13. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control, Atlanta, GA, 1985.
14. Tripathi K, Tripathi P, Nema S, Shrivastava A, Dwiwedi K, Dhanvijay A. Modified Petroff's Method: an Excellent Simplified Decontamination Technique in Comparison with Petroff's Method. *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*. 2014; 10(3):461–4.
15. Berg S, Firdessa R, Habtamu M, Gadisa E, Mengistu A, Yamuah L, et al. The burden of mycobacterial disease in ethiopian cattle: implications for public health. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5068. Correction: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005068> PMID: 19352493.
16. Smith NH, Upton P. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex; www.Mbovis.org. *Infect Genet Evol*. 2012; 12(4):873–6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.002> PMID: 21855653.

17. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(4):755–66. Epub 2012/03/01. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004> PMID: 22365971.
18. Kohl TA, Utpatel C, Niemann S, Moser I. Mycobacterium bovis Persistence in Two Different Captive Wild Animal Populations in Germany: a Longitudinal Molecular Epidemiological Study Revealing Pathogen Transmission by Whole-Genome Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2018; 56(9). Epub 2018/06/29. <https://doi.org/10.1128/JCM.00302-18> PMID: 29950330.
19. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998; 144 (Pt 5):1189–96. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1189> PMID: 9611793
20. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SMM, Scott AN, Brittain D, et al. Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology (Reading).* 2002; 148(Pt 2):519–28. Epub 2002/02/08. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-519> PMID: 11832515.
21. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. Epub 1988/11/01. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988> PMID: 3069867
22. Damene H, Tahir D, Diels M, Berber A, Sahraoui N, Rigouts L. Broad diversity of Mycobacterium tuberculosis complex strains isolated from humans and cattle in Northern Algeria suggests a zoonotic transmission cycle. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(11):e0008894. Epub 2020/12/01. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894> PMID: 33253150.
23. Sahraoui N, Muller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R, et al. Molecular characterization of Mycobacterium bovis strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Vet Res.* 2009; 5:4. Epub 2009/01/29. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-4> PMID: 19173726.
24. Yahyaoui-Azami H, Aboukhasib H, Bouslikhane M, Berrada J, Rami S, Reinhard M, et al. Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco. *Bmc Veterinary Research.* 2017;13. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0929-8> PMID: 28061787.
25. Djemal SE, Siala M, Smaoui S, Kammoun S, Marouane C, Bezos J, et al. Genetic diversity assessment of Tunisian Mycobacterium bovis population isolated from cattle. *BMC Vet Res.* 2017; 13(1):393. Epub 2017/12/17. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1314-y> PMID: 29246228.
26. Hauer A, De Cruz K, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henault S, et al. Genetic Evolution of Mycobacterium bovis Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978. *Plos One.* 2015; 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117103> PMID: 25658691.
27. Tazerart F, Saad J, Niar A, Sahraoui N, Drancourt M. Mycobacterium bovis Pulmonary Tuberculosis, Algeria. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27(3):972–4. Epub 2021/02/25. <https://doi.org/10.3201/eid2703.191823> PMID: 33622469.
28. Ghavidel M, Mansury D, Nourian K, Ghazvini K. The most common spoligotype of Mycobacterium bovis isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; A systematic review. *Microb Pathog.* 2018; 118:310–5. Epub 2018/03/27. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.036> PMID: 29578066.
29. Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of Mycobacterium bovis isolates. Review of main techniques and applications. *Res Vet Sci.* 2004; 76(1):1–18. Epub 2003/12/09. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(03\)00078-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(03)00078-x) PMID: 14659724.
30. Biffa D, Skjerve E, Oloya J, Bogale A, Abebe F, Dahle U, et al. Molecular characterization of Mycobacterium bovis isolates from Ethiopian cattle. *BMC Vet Res.* 2010; 6:28. Epub 2010/05/29. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-28> PMID: 20507576.
31. Lamine-Khemiri H, Martinez R, Garcia-Jimenez WL, Benitez-Medina JM, Cortes M, Hurtado I, et al. Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae isolates from cattle of Tunisia. *Trop Anim Health Prod.* 2014; 46(2):305–11. Epub 2013/10/26. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0488-y> PMID: 24158359.
32. Müller B, Steiner B, Bonfoh B, Fané A, Smith NH, Zinsstag J. Molecular characterisation of Mycobacterium bovis isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC Vet Res.* 2008; 4:26. Epub 2008/07/19. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-26> PMID: 18637160.
33. Mekonnen GA, Mihret A, Tamiru M, Hailu E, Olani A, Aliy A, et al. Genotype Diversity of Mycobacterium bovis and Pathology of Bovine Tuberculosis in Selected Emerging Dairy Regions of Ethiopia. *Front Vet Sci.* 2020; 7:553940. Epub 2020/11/17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.553940> PMID: 33195524.
34. de la Fuente J, Diez-Delgado I, Contreras M, Vicente J, Cabezas-Cruz A, Tobes R, et al. Comparative Genomics of Field Isolates of Mycobacterium bovis and M. caprae Provides Evidence for Possible

- Correlates with Bacterial Viability and Virulence. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(11):e0004232. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004232> PMID: 26583774.
35. Matos F, Amado A, Botelho A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the first outbreak of bovine tuberculosis in the Azores Islands: a case report. Vet Med (Praha). 2010; 55(3):133–6. <https://doi.org/10.17221/137/2009-Vetmed>
 36. Boniotti MB, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. J Clin Microbiol. 2009; 47(3):636–44. Epub 2009/01/16. <https://doi.org/10.1128/JCM.01192-08> PMID: 19144792.
 37. Boschirolu ML, Michelet L, Hauer A, de Cruz K, Courcou A, Hénault S, et al. Tuberculose bovine en France: cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000–2013. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation. 2015; 70:2–8.
 38. Matos F, Cunha MV, Canto A, Albuquerque T, Amado A, Botelho A. Snapshot of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* infections in livestock in an area with a low incidence of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol. 2010; 48(11):4337–9. Epub 2010/09/17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01762-10> PMID: 20844227.
 39. Proding WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirolu ML, et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. J Clin Microbiol. 2005; 43(10):4984–92. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4984-4992.2005> PMID: 16207952.
 40. Rodriguez S, Bezos J, Romero B, de Juan L, Alvarez J, Castellanos E, et al. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. Emerg Infect Dis. 2011; 17(3):532–5. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100618> PMID: 21392452.
 41. Siala M, Cassan C, Smaoui S, Kammoun S, Marouane C, Godreuil S, et al. A first insight into genetic diversity of *Mycobacterium bovis* isolated from extrapulmonary tuberculosis patients in South Tunisia assessed by spoligotyping and MIRU VNTR. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(9):e0007707. Epub 2019/09/19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007707> PMID: 31532767.
 42. Sahraoui N, Müller B, Djamel Y, Fadela B, Rachid O, Jakob Z, et al. Evaluation des VNTR (variable number of tandem repeats) des isolats de *Mycobacterium bovis* en Algérie. Ann Biol Clin (Paris). 2010; 68(4):449–53. Epub 2010/07/24. <https://doi.org/10.1684/abc.2010.0459> PMID: 20650740.
 43. Bolado-Martinez E, Benavides-Davila I, Candia-Plata Mdel C, Navarro-Navarro M, Aviles-Acosta M, Alvarez-Hernandez G. Proposal of a Screening MIRU-VNTR Panel for the Preliminary Genotyping of *Mycobacterium bovis* in Mexico. Biomed Res Int. 2015; 2015:416479. Epub 2015/05/07. <https://doi.org/10.1155/2015/416479> PMID: 25945333.
 44. Kohl TA, Kranzer K, Andres S, Wirth T, Niemann S, Moser I. Population structure of *Mycobacterium bovis* in Germany: A long-term study using Whole Genome Sequencing combined with conventional molecular typing methods. J Clin Microbiol. 2020. Epub 2020/08/21. <https://doi.org/10.1128/JCM.01573-20> PMID: 32817084
 45. Rodríguez-Campos S, Navarro Y, Romero B, de Juan L, Bezos J, Mateos A, et al. Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. J Clin Microbiol. 2013; 51(11):3658–65. Epub 2013/08/30. <https://doi.org/10.1128/JCM.01271-13> PMID: 23985914.
 46. Yang L, Wang C, Wang H, Meng Q, Wang Q. Evaluation of MIRU-VNTR for typing of *Mycobacterium bovis* isolated from Sika deer in Northeast China. BMC Vet Res. 2015; 11:93. Epub 2015/04/19. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0402-0> PMID: 25889075.
 47. Bouklata N, Supply P, Jaouhari S, Charof R, Seghrouchni F, Sadki K, et al. Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex by 24-Locus Based MIRU-VNTR Typing in Conjunction with Spoligotyping to Assess Genetic Diversity of Strains Circulating in Morocco. PLoS One. 2015; 10(8):e0135695. Epub 2015/08/19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135695> PMID: 26285026.
 48. Cowie CE, Hutchings MR, Barasona JA, Gortázar C, Vicente J, White PCL. Interactions between four species in a complex wildlife: livestock disease community: implications for *Mycobacterium bovis* maintenance and transmission. Eur J Wildlife Res. 2015; 62(1):51–64. <https://doi.org/10.1007/s10344-015-0973-x>
 49. Katale BZ, Mbugi EV, Siame KK, Keyyu JD, Kendall S, Kazwala RR, et al. Isolation and Potential for Transmission of *Mycobacterium bovis* at Human-livestock-wildlife Interface of the Serengeti Ecosystem, Northern Tanzania. Transbound Emerg Dis. 2017; 64(3):815–25. Epub 2015/11/14. <https://doi.org/10.1111/tbed.12445> PMID: 26563417.
 50. Aranaz A, De Juan L, Montero N, Sanchez C, Galka M, Delso C, et al. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. J Clin Microbiol. 2004; 42(6):2602–8. Epub 2004/06/09. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2602-2608.2004> PMID: 15184440.

51. El Mrini M, Kichou F, Kadiri A, Berrada J, Bouslikhane M, Cordonnier N, et al. Animal tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Eurasian wild boar from Morocco. *Eur J Wildlife Res.* 2016; 62(4):479–82. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-1022-0>
52. Loiseau C, Menardo F, Aseffa A, Hailu E, Gumi B, Ameni G, et al. An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evol Med Public Health.* 2020; 2020(1):49–59. Epub 2020/03/27. <https://doi.org/10.1093/emph/eoaa005> PMID: 32211193.
53. Smith NH. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infection Genetics and Evolution.* 2012; 12(4):857–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.007> PMID: 21945588.
54. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 2014; 97:S5–S19. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009> PMID: 24630673.
55. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One.* 2009; 4(11):e7815. Epub 2009/11/17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007815> PMID: 19915672.
56. Malama S, Johansen TB, Muma JB, Munyeme M, Mbulo G, Muwonge A, et al. Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. *Vet Med Int.* 2014; 2014:187842. Epub 2014/05/23. <https://doi.org/10.1155/2014/187842> PMID: 24847441.
57. Machado A, Rito T, Ghebremichael S, Muhate N, Maxhuza G, Macuamule C, et al. Genetic diversity and potential routes of transmission of *Mycobacterium bovis* in Mozambique. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(1):e0006147. Epub 2018/01/19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006147> PMID: 29346413.
58. Brites D, Loiseau C, Menardo F, Borrell S, Boniotti MB, Warren R, et al. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Frontiers in microbiology.* 2018; 9:2820. Epub 2018/12/13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02820> PMID: 30538680.



Tuberculosis Lesions of Bovine Carcasses in Algerian Municipal Abattoirs and Associated Risk Factors

FAÏZA BELAKEHAL^{1*}, IRMGARD MOSER^{3,4}, MALEK NAIM², SAFIA ZENIA¹, TAHA-MOSSADAK HAMDI¹

¹Laboratory of Food Hygiene and Quality Insurance System, High National Veterinary School, Rue Issad Abbès, 16111 El Alia, Oued Smar, Algiers, Algeria; ²Department of Microbiology, Central Military Hospital, 16050 Kouba, Algiers, Algeria; ³Friedrich-Loeffler-Institut/Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis, Naumburger Str. 96a, D-07743 Jena, Germany; ⁴National Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, at Friedrich-Loeffler-Institut/Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis, Naumburger Str. 96a, D-07743 Jena, Germany.

Abstract | Bovine tuberculosis (bTB) is a transmissible disease of livestock with high economic consequences. To estimate the prevalence and risk factors associated to bTB, a study was conducted in Algerian abattoirs involving detailed inspection, microscopic examination, culture of tissue samples and molecular investigation. Out of 3848 bovine carcasses examined, 184 (4.78%) exhibited visible lesions suggestive of tuberculosis (TB). Anatomically 84.8% of the lesions were found in thoracic cavity. Lesions were predominant in tracheobronchial lymph nodes (71.7%), lung tissue (4.9%) and retropharyngeal lymph nodes (4.9%), followed by hepatic tissue (3.8%) and retrohepatic lymph nodes (3.8%). Less frequently, lesions were observed in prescapular lymph nodes (1.6%), digestive tract (0.5%) and kidney (0.5%). The study revealed statistically high ($p < 0.0001$) infection rate in males (78.8%) than females (21.2%). A Significant difference ($p < 0.05$) in TB infection rate was recorded between the three age/animal categories: 2 to 6 years (42.9%), < 2 years (39.1%) and ≥ 6 years (17.9%). Analysis of data recorded in the present study showed a high significant variation ($p < 0.0001$) in seasonal prevalence of bTB with a higher frequency during dry season than in rainy season. Microscopic examination of 105 samples revealed that 60 (57.1%) harbored acid-fast bacilli (AFB) and 45 (42.9%) were negative ($p > 0.05$). Culture yielded 60 (57.1%) positive, 43 (41%) negative and only 2 (1.9%) samples were contaminated. In PCR RD9 analysis, all isolated strains were belong to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). The present findings can serve as background information to elaborate an adequate eradication program for bTB in Algeria.

Keywords | Bovine tuberculosis, Lesions, Slaughterhouses, Prevalence, Risk factor

Received | August 05, 2021; **Accepted** | September 05, 2021; **Published** | November 15, 2021

***Correspondence** | Faiza Belakehal, Laboratory of Food Hygiene and Quality Insurance System, High National Veterinary School, Rue Issad Abbès, 16111 El Alia, Oued Smar, Algiers, Algeria; **Email:** faiza.belakehal@gmail.com

Citation | Belakehal F, Moser I, Naim M, Zenia S, Hamdi TM (2021). Tuberculosis lesions of bovine carcasses in algerian municipal abattoirs and associated risk factors. J. Anim. Health Prod. 9(4): 479-486.

DOI | <http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2021/9.4.479.486>

ISSN | 2308-2801

Copyright © 2021 Belakehal et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

In Algeria, livestock production is an important part of agriculture, it account for a significant proportion of gross national agricultural income. Livestock farming is predominantly extensive (Bengouga et al., 2019) and mainly distributed in the North part of the country. Tuberculosis

(TB) is an ancient disease, discovered in the relics of ancient Egypt, India and China (Good et al., 2018). In 1882, Robert Koch presented his findings in his famous lecture at the Berliner Physiologischen Gesellschaft in Berlin, where he described the isolation of the causative agent from human and animal samples. In developing countries, TB represents a major cause of organ condemnation according to

meat inspection of cattle carcasses at slaughterhouses, after fasciolosis, hydatidosis and cysticercosis. Therefore, TB is of great economic importance in these countries (Addis, 2017). In Algeria, the animal TB status is not clear, due to the lack of an official data, in addition, the scale of zoonotic transmission is not well documented. Nevertheless, the cultural practices that exist could facilitate the elucidation of transmission between cattle and humans. Meat inspection in slaughterhouses play an important role to fight against bTB in Algeria. The aim of this study is to generate data on the prevalence of bTB in Algeria, through a risk factor study of abattoir records and thus to contribute to the knowledge on the epidemiology of the disease. This study can serve as a background information for guidelines for control measures.

MATERIALS AND METHODS

POSTMORTEM INSPECTION PROCEDURES

The TB detection was conducted by the abattoir assistant meat inspector, according to the guidelines recommended by the Algerian Ministry of Agriculture and Rural Development (MADRP). Inspection of carcasses for the presence of visible lesions involves palpation and incision into thin sections of lymph nodes (Ln). The cut surfaces were examined carefully for the presence of abscess, caseous mass and tubercles.

COLLECTION OF SAMPLES

The samples (n = 184) were collected from bovine carcasses (n = 3848) after meat inspection in four slaughterhouses, during the rainy season from October to March and the dry season from April to September. Samples of approximately 50g from each organ or Ln are randomly collected using a sterile single-use scalpel. These samples were placed in hermetically sealed, sterile, single-use vials and labeled with the age, the sex of animal and the collection date.

ZIEHL-NEELSEN ACID FAST STAINING AND CULTURE

Samples are transported to the Reference Laboratory of Mycobacteria and Control of Drug Resistance at Pasteur Institute of Algeria (IPA). From 184 positive carcasses a sample of 105 tissues lesions are examined by culture and direct smear microscopy using Ziehl-Neelsen staining for recording the presence of AFB. The tissue samples are decontaminated according to modified Petroff's method (Tripathi et al., 2014). Briefly, an amount of 5ml of 4% NaOH solution was added to about 10g of tissue minced by a mortar in 4ml of sterile distilled water, and incubated for 15min. The suspension is neutralized by 10 ml of sterile distilled water and then centrifuged at 3000rpm for 20 min. The pellet was used as an inoculum to Löwenstein-Jensen as solid culture medium. The culture of mycobacteria was performed in a minimum of 8 to 12 weeks at

37°C (OIE, 2008).

MOLECULAR INVESTIGATION

Bacterial DNA is extracted using thermal lysis method following the protocol of Berg et al. (2009). The PCR was performed on 60 strains for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) members using oligonucleotide primers for detection of the RD9 deletion. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) BCG (DSMZ 43990, ATCC 27289) and *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) H37Rv strains served as positive controls (Table 1).

STATISTICAL ANALYSIS

The data obtained were entered into Microsoft Excel 2010 spread sheets and analyzed using the SPSS-Version 20.0. Chi-square test was used to analyze the data for disease occurrence and associated risk factors of sex, age and season. Interval of confidence is of 95% for the determination of prevalences and for the study of risk factors. P-value was held at <0.05 for significance.

RESULTS

Results obtained are reported in tables 2 to 8. From 3848 inspected carcasses, 184 (4.78%), presented suspected bovine tuberculosis lesions (Table 2). Among 184 carcasses with visible TB lesions, 39 (21.2%) were females and 145 (78.8%) were males (Table 3). Out of 184 carcasses presenting visible lesions of TB, 72(39.1%) were less than 2 years old, 33(17.9%) were older than 6 years, and 79 (42.9%) were between 2 and 6 years old (Table 4).

TB suspected lesions were mainly detected in thoracic cavity, with high prevalence in tracheobronchial Ln 132 (71.7%) (Table 5). Lesions were also observed in some other Ln and organ tissues (Table 5). Below are some examples of bovine TB lesions encountered in slaughterhouses (Figure 1), showing pleura with solid spherical formations covered with yellowish nodules (Pearl disease) (Figure 1a), tracheobronchial Ln section with yellowish caseous consistence (Figure 1b), digestive tract showing TB lesion in the rumen wall (Figure 1c). Higher prevalence of TB suspected lesions were recorded during dry season 140(76.09%) (Table 6). Results of microscopic examination revealed that 60 samples were positive and 45 were negative (Table 7; Figure 2). Culture of mycobacteria indicate that 60/105 samples had characteristic colonies of *M. bovis* (Table 8). Molecular identification by PCR RD9 revealed that all 60 strains analyzed are members of MTC (Figure 3).

Table 1: Oligonucleotide primers used for molecular identification of mycobacteria isolates and sizes of the PCR products.

Locus	Primer name	Primer sequence	Present (<i>M.tuberculosis</i>)	Deleted (<i>M.bovis</i>)
RD 9	RD9_FlankF	AACACGGTCACGTTGTCTGTG	396	575
	RD9_FlankR	CAAACCAGCAGCTGTCTGTG		
	RD9_InternalR	TTGCTTCCCCGGTTCGTCTG		

Table 2: Prevalence of bTB in four slaughterhouses from North Algeria

Abattoir	Cattle Examined (No.)	Positive (No.)	Mean (%)	Prevalence (%)	IC (%)	p
Hussein Dey	2207	98	53.3	4.44	0.46-0.60	<0.0001
El Harrach	1167	62	33.7	5.31	0.26-0.40	
Hadjout	344	17	9.2	4.94	0.05-0.13	
Dellys	130	7	3.8	5.38	0.02-0.08	
Total	3848	184	25	4.78	0.04-0.05	

IC: Interval of confidence is of 95%

Table 3: Prevalence of bTB with respect to sex

Sex	Positive(No.)	Prevalence (%)	IC (%)	p
Female	39	21.2	0.16-0.28	<0.0001
Male	145	78.8	0.72-0.84	
Total	184	100		

IC: Interval of confidence is of 95%

Table 4: Prevalence of bTB with respect to age

Age	Positive(No.)	Prevalence (%)	IC (%)	p
< 2 years	72	39.1	0.32-0.46	<0.0001
2 to 6 years	79	42.9	0.36-0.50	
≥6 years	33	17.9	0.13-0.24	
Total	184	100		

IC: Interval of confidence is of 95%

Table 5: Distribution of TB lesions in slaughtered cattle

Localization	Positive(No.)	Prevalence(%)	IC (%)	p
Sternal Ln	1	0.5	0.001-0.03	<0.0001
Retrohepatic Ln	7	3.8	0.02-0.08	
Pulmonary (Inspector) Ln	4	2.2	0.01-0.05	
Mediastinal Ln	6	3.3	0.02-0.07	
Prescapular Ln	3	1.6	0.01-0.05	
Retropharyngeal Ln	9	4.9	0.03-0.09	
Tracheobronchial Ln	132	71.7	0.65-0.78	
Pleura	4	2.2	0.01-0.05	
Kidney	1	0.5	0.001-0.03	
Digestif tract	1	0.5	0.001-0.03	
Hepatic tissue	7	3.8	0.02-0.08	
Lung tissue	9	4.9	0.03-0.09	
Total	184	100		

IC: Interval of confidence is of 95%, Ln: Lymph node

Table 6: Prevalence of bTB with respect to season

Season	Positive(No.)	Prevalence(%)	IC(%)	p
Dry	140	76.09	0.7-082	<0.0001
Rainy	44	23.91	0.17-0.30	
Total	184	100		

IC: Interval of confidence is of 95%

Table 7: Prevalence of bTB in bovine carcasses analyzed by direct smear microscopy

Microscopy	Prevalence(No.)	Prevalence(%)	IC(%)	p
Positive	60	57.1	0.48-0.66	>0.05
Negative	45	42.9	0.34-0.52	
Total	105	100		

IC: Interval of confidence is of 95%

Table 8: Prevalence of bTB in bovine carcasses analyzed by culture technique

Culture	Prevalence (No.)	Prevalence(%)	IC(%)	P
Contaminated	2	1.9	0.01-0.07	<0.05
Positive	60	57.1	0.48-0.66	
Negative	43	41.0	0.32-0.51	
Total	105	100		

IC: Interval of confidence is of 95%

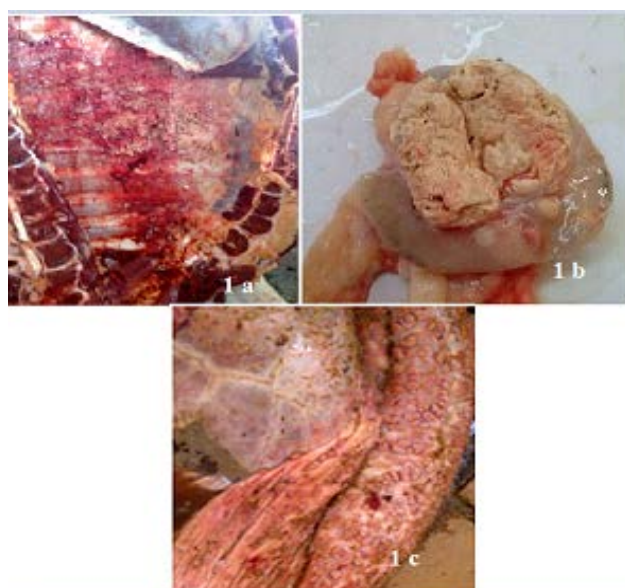


Figure 1: Bovine tuberculosis lesions discovered in slaughterhouses. Pleura with solid spherical formations covered with yellowish nodules (Pearl disease) (a), tracheobronchial Ln section with yellowish caseous consistence (b), digestive tract showing TB lesion in the rumen wall(c).

DISCUSSION

Of 3848 bovine carcasses inspected, 184 (4.78%) presented suspicious lesions of bTB (Table 2). This prevalence is higher than those reported in Algeria by Sahraoui et al. in 2008 (3.58%) and Ayad et al. in 2020 (2.06%), however, it

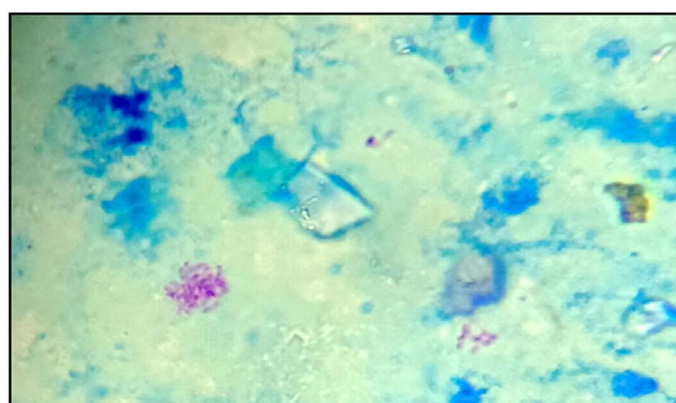


Figure 2: Acid-fast bacilli appeared as pinkish coccobacilli in a bluish background detected in lymph nodes from calve (x100).

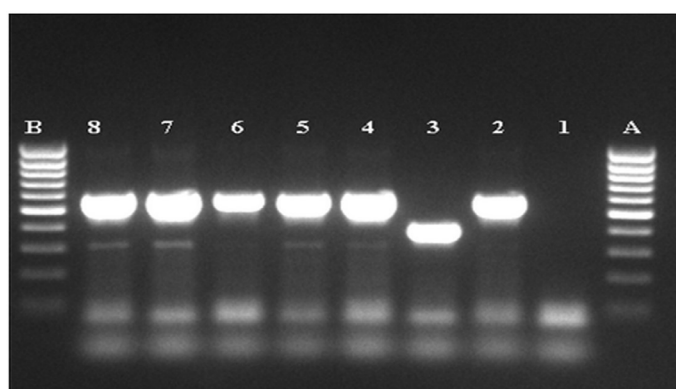


Figure 3: Agarose gel electrophoresis of the amplified MTC product. A, B: DNA marker (80-1000pb), 1: negative, control, 2: positive control *M.bovis* (BCG), 3: positive control *M.tuberculosis* (H37Rv), 4-8: MTC PCR product.

is lower than that recorded in a recent study by [Damene et al. in 2020](#) (6.5%). [Hamid et al. in 2019](#) in Morocco recorded a similar prevalence (4.6%). Several studies in Africa reported higher prevalences; including [Pal et al. in 2017](#) (5.7%), [Terefe, in 2014](#) (6.79%) and [Aylate et al. in 2013](#) in Ethiopia (8.4%), [Egbe et al. in 2016](#) in Cameroon (12-17%), [Cleaveland et al. in 2007](#) in Tanzania (19.8%) and [Atiadeve et al. in 2014](#) in Ghana (34%). This may indicate the enzootic nature of the disease in the prevalent country. In addition, the non-respect or the absence of concept of border barriers may explain the high prevalence of the disease in these countries.

Our results show a statistically significant difference ($p < 0.05$) in infection rates between male and female carcasses, the highest rate recorded in males (78.8%) as compared to females (21.2%) ([Table 3](#)). Our results differ from those of [Nalapa et al. \(2017\)](#) (12.4%) in Uganda and [Nuru et al. \(2015\)](#) (87.9%) in Ethiopia, who reported that females had a higher risk of developing bTB-like lesions compared to males.

Our results show a significant difference in susceptibility to TB infection between the different categories of cattle: bulls, cows and calves ([Table 4](#)). A Significant difference ($p < 0.05$) in rate was recorded among the three age categories of animals. Age was found to be related to the distribution of bTB reactors with low prevalence in younger age groups and high values in older ones ([Munyeme et al., 2009](#)). Whereas, in the present study, young (<2 years) and adult animals (2 to 6 years) seems to be more frequently infected by TB than older ones (≥ 6 years). This seemed to be due to the fairly regular flow of cattle sent out to slaughterhouse at the end of their productive cycle, on average at 5 years of age ([Rossi et al., 2015](#)). In contrast, the survey by [Traoré et al. \(2004\)](#), shows that a cattle aged >6 years are more reactive to TB than a younger one.

Patterns of [Mekonnen et al. \(2019\)](#), indicate that bTB reactors increase to a peak at 5 to 7 years of age. This increase could be linked to a longer exposure time to the *M. bovis*. Overall, the observation of lesion in calves could be explained by congenital transmission in utero. Pseudo-vertical transmission (like ingestion of contaminated colostrums) is often referred to the close contact between cows and their calves.

Calves and bulls are destined earlier for slaughter in order to cover the population's demand for meat consumption, while females are kept until an advanced age for reproductive reasons and to exploit maximum milk production during their lifetime. [Brooks-Pollock et al. \(2014\)](#) showed that reactor rates to the comparative cervical test for bTB increased with age for the first 2-3 years for beef, but also

for dairy cattle in Great Britain. In fact, this was expected for cow-calf herds, since calves spend most of their time with their dam before being weaned and moved away ([Rossi et al., 2019](#)).

Most of bTB like lesions were anatomically located in the thoracic cavity (84.8%) ([Table 5](#), [Figure 1a](#)), mainly in respiratory tract. These were mainly in the tracheobronchial Ln (71.7%) ([Figure 1b](#)), lung tissue (4.9%), mediastinal Ln (3.3%), pleura (2.2%), pulmonary (Inspector) Ln (2.2%) and sternal Ln (0.5%). Another localization was observed in the liver tissue and associated (retrohepatic) Ln (7.6%) and retropharyngeal Ln (4.9%). The TB lesions were less noticed in the prescapular Ln (1.6%), in the digestive tract (0.5%) ([Figure 1c](#)) and in the kidney (0.5%).

The route of transmission determines the location and spectrum of lesions observed in bTB ([Serrano et al., 2018](#)). According to [Michel et al. \(2010\)](#), overall, the TB lesions most often occur in the lungs and the retropharyngeal, bronchial, mediastinal and mesenteric Ln. Our results are in agreement with those of [Menzies and Neill \(2000\)](#), in which TB lesions are observed mostly in thoracic cavity 57%. Similarly, [Boukary et al. \(2012\)](#) identified 92.77% of gross lesions in the lungs. Detection of lesions in the thoracic cavity (Ln) suggests that the respiratory tract is the entry point for *M. bovis* infection.

On the other hand, ingestion of *M. bovis* from contaminated pasture, feed, or water usually results in mesenteric Ln lesions ([Menzies and Neill, 2000](#)) and few or no visible lesions on the intestinal wall ([Neill et al., 2001](#)), which could explain the presence of this lesion in our study at a very low frequency (0.5%) ([Figure 1c](#)). The presence of lesions in the liver could be related to transplacental transmission to the fetus probably as a result of TB endometritis from the cow ([Domingo et al., 2014](#)). [Corner et al. \(1990\)](#) observed that the most frequently involved organ was the medial retropharyngeal Ln (29.4%), followed by mediastinal Ln (28.2%), tracheobronchial Ln (18.0%), lung tissue (8.0%), mesenteric Ln (2.9%), parotid Ln (2.4%) and cervical caudal Ln (2.4%). In summary, although the aerogenous route is the most common pathway of infection in both domestic ruminants and human beings and most cases of bTB involve the lungs and respiratory Ln ([O'Reilly and Daborn, 1995](#)), the oropharyngeal route is also a frequent pathway of entry that is probably more relevant than previously thought ([Domingo et al., 2014](#)).

Analysis of data recorded in the present study shows that bTB is present during all seasons, but with high frequency during dry season ($p < 0.05$) particularly July and August ([Table 6](#)). According to [Awah-Ndukum et al. \(2010\)](#) from Cameroon, the detection of TB lesions is not influenced by

season but were high during stressful periods such as inter season and peak-season periods. Boukary et al. (2012), Raufu and Ameh (2010) and, Sa'idu et al. (2017) from Nigeria reported that the frequency of lesions was higher at the beginning of the rainy season (July and August).

The high frequency of TB lesions during the dry season (76.09%), observed in our study, could be attributed to the massive destocking of animals by farmers during this season, and the high number of cattle presented for slaughter especially during summer which corresponds to the period of traditional celebrations and thus a high demand for meat. The period of winter concurs with the return of animals from transhumance. During the winter season, animals are confined to their farms because of the rains, thus, so close contact between animals promotes the transmission of TB infection. Animals are infected during the cold season and express the disease after a long incubation period during the dry season.

In current investigation, 60/105 (57.1%) samples tested were AFB positive by smear microscopy, 45 (42.9%) were negative (Table 7). The number of positive samples for AFB was greater than the negative ones with no significant difference ($p > 0.05$). This analysis demonstrates that Ziehl-Neelsen technique gives a good sensitivity for the detection of AFB in our samples.

Results of Aljameel et al. (2014) showed that out of 163 analyzed samples, 124 (76.1%) were smear positive while 39 (23.9%) were AFB negative. One of the explanation supplied could be related to the small number of samples examined in our study. Three modes of bacilli appearance are distinguished in the present study, most of them are single or grouped into two or three bacilli long filaments, resembling the *M. tuberculosis* species. Other forms, such as small shaped bacilli were observed, but rarely coccobacilli (Figure 2). The bacilli were usually pink colored. Nevertheless, conventional methods for TB detection using AFB microscopic staining are insensitive due to the potential confusion with other AFB genera such as *Gordonia*, *Norcadia*, *Rhodococcus* and *Tsukamurella* (Talip et al., 2013). From a total of 105 samples cultured, 60 were positives (57.1%), 43 were negative (41.0%) and 2 were (1.9%) contaminated (Table 8). The positive cultures ($n=60$) analyzed by PCR RD9, belonging to the MTC (Figure 3). Courcoul et al. (2015) study shows, that PCR is more sensitive and specific than bacteriology. This makes PCR a useful tool that could potentially become an official bTB diagnostic test in Algeria.

CONCLUSION

The post-mortem examination results revealed that the

prevalence of bTB in Algeria is relatively low (4.78%). It is suggested that on the basis of this finding, the TB could not be underestimated, because in some cases lesions may not be sufficiently developed to be able to detect during routine inspection at the slaughterhouses. Gender, age and season were recognized as important risk factors associated with bTB infection. Males (78.8%) were found more susceptible to infection than females (21.2%); young (39.1%) and adult (42.9%) animals were more susceptible to infection than older one (17.9%); and dry season (76.09%) seems to be the most favorable period for the spread of the disease as compared to rainy season (23.91%). These results should interpolate the competent health authorities to adopt effective control strategies and appropriate measures for the prevention of bTB in Algeria, and development of laboratories specialized in the diagnosis of animal TB as well.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the veterinarians experts of the abattoir of Hussein Dey, El Harrach, Hadjout and Dellys; Dr Seyad F, Dr Boussakssou H, Dr Haouassine R, Dr Ismail S, Dr Baka A, Dr Kouidri A and Dr El Farci S, for their excellent support to perform the post mortem examination.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHORS CONTRIBUTION

Conceptualization: FB, MN, TMH

Data curation: FB

Formal analysis: SZ, FB

Investigation: FB

Methodology: FB

Supervision: TMH, MN

Visualization: IM, FB

Writing – original draft: FB

FB conceived, designed the study and drafted the manuscript under the supervision of TMH and MN. FB designed the experiment protocol. FB collected and analyzed samples. FB and SZ performed the statistical analysis. FB revised the manuscript under the supervision of IM and TMH. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Addis BA (2017). Causes of organ condemnation and economic loss of cattle in developing countries. Review. IJERD. 5(1): 776-796.
- Aljameel MA, Abdel Wahab MB, Fayza AO, El Tigani AE,

- Abdellatif MM (2014). Occurrence of bovine tuberculosis at Nyala abattoirs in South Darfur State, Sudan. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 67 (2) : 61-65. <https://doi.org/10.19182/remvt.10185>
- Atiadeve SK, Gyamfi OK, Mak-Mensah E, Galyuon IKA, Owusu D, Bonsu FA, Bedzra KD, Gyasi RK (2014). Slaughter surveillance for tuberculosis among cattle in three metropolitan abattoirs in Ghana. *J. Vet. Med. Anim. Health.* 6(7): 198-207. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2014.0291>
- Awah Ndukum J, Kudi AC, Bradley G, Ane-Anyangwe IN, Fon-Tebug S, Tchoumboue J (2010). Prevalence of bovine tuberculosis in abattoirs of the Littoral and Western highland regions of Cameroon: A cause for public health concern. *Vet. Med. Int.* 1-8. <https://doi.org/10.4061/2010/495015>
- Ayad A, Bensid A, Benabdelhak AC, Ait-Yahia F, Dergal NB (2020). First report on tuberculosis based on slaughterhouse data in Bejaia province, Algeria: a retrospective 10-year survey. *Kocatepe Vet. J.* 13(2):118-124. <https://doi.org/10.30607/kvj.683269>
- Aylate A, Shah SN, Aleme H, Gizaw TT (2013). Bovine tuberculosis: prevalence and diagnostic efficacy of routine meat inspection procedure in Woldiya municipality abattoir north Wollo zone, Ethiopia. *Trop. Anim. Health. Prod.* 45(3): 855-864. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0298-7>
- Bengouga K, Lahmadi S, Zeguerou R, Maaoui M, Halis Y (2019). Livestock in rural piedmont regions of algeria. *Biotechnol. Anim. Husb.* 35 (2): 199-208. <https://doi.org/10.2298/BAH1902199B>
- Berg S, Firdessa R, Habtamu M, Gadisa E, Mengistu A, Yamuah L, Ameni G, Vordermeier M, Robertson BD, Smith NH, Engers H, Young D, Hewinson RG, Aseffa A, Gordon SV (2009). The Burden of mycobacterial disease in ethiopian cattle: implications for public health. *PLoS One.* 4 (4): e5068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005068>
- Boukary AR, Thys E, Rigouts L, Matthys F, Berkvens D, Mahamadou I, Yenikoye A, Saegerman C (2012). Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in Niger. *Transbound. Emerg. Dis.* 59(6): 490-502. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01302.x>
- Brooks-Pollock E, Roberts GO, Keeling MJ (2014). A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. *Nature.* 511 : 228-231. <https://doi.org/10.1038/nature13529>
- Cleaveland S, Shaw DJ, Mfinanga SG, Shirima G, Kazwala RR, Eblate E, Sharp M (2007). *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis (Edinb).* 87(1): 30-43. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.03.001>
- Corner LA, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, Rothel JS (1990). Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust. Vet. J.* 67 (11): 389-392. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1990.tb03020.x>
- Courcoul A, Moya JL, Brugere L, Faye S, Henault S, Gares H, Boschiroli ML (2014). Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS One.* 9(3): e90334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090334>
- Damene H, Tahir D, Diels M, Berber A, Sahraoui N, Rigouts L(2020). Broad diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from humans and cattle in Northern Algeria suggests a zoonotic transmission cycle. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14(11): e0008894. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894>
- Domingo M, Vidal E, Marco A (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97 Suppl: S20-S29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>
- Egbe NF, Muwonge A, Ndip L, Kelly RF, Sander M, Tanya V, Ngu Ngwa V, Handel IG, Novak A, Ngandalo R, Mazeri S, Morgan KL, Asuquo A, Bronsvoort BM (2016). Abattoir based estimates of mycobacterial infections in Cameroon. *Sci. Rep.* 6: 24320. <https://doi.org/10.1038/srep24320>
- Good M, Bakker D, Duignan A, Collins DM (2018). The history of in vivo tuberculin testing in bovines: tuberculosis, a “One Health” issue. *Front. Vet. Sci.* 5: 59. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00059>
- Hamid A, Abdelali B, Mohammed H, Hind YA, Mohammed B (2019). Prevalence of bovine tuberculosis gross lesions in Doukkala slaughterhouses, Morocco. *ESJ.* 15(18):38. <https://doi.org/10.19044/esj.2019.v15n18p38>
- Mekonnen GA, Conlanb AJK, Berg S, Ayele BT, Alemua A, Guta S, Lakew M, Tadesse B, Gebre S, Wood JLN, Ameni G, The ETHICOBOTS consortium (2019). Prevalence of bovine tuberculosis and its associated risk factors in the emerging dairy belts of regional cities in Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 168: 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.04.010>
- Menzies FD, Neill SD (2000). Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *Vet J.* 160(2): 92-106. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0482>
- Michel AL, Müller B, van Helden PD (2010). *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet. Microbiol.* 140(3-4): 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.029>
- Munyeme M, Muma JB, Samui KL, Skjerve E, Nambota AM, Phiri IGK, Rigouts L, Tryland M (2008). Prevalence of bovine tuberculosis and animal level risk factors for indigenous cattle under different grazing strategies in the livestock/wildlife interface areas of Zambia. *Trop. Anim. Health. Prod.* 41(3): 345-352. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9195-5>
- Nalapa DP, Muwonge A, Kankya C, Olea-Popelka F (2017). Prevalence of tuberculous lesion in cattle slaughtered in Mubende district, Uganda. *BMC Vet. Res.* 13(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0991-x>
- Neill SD, Bryson DG, Pollock JM (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2): 79-86. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0279>
- Nuru A, Mamo G, Teshome L, Zewdie A, Medhin G, Pieper R, Ameni G (2015). Bovine tuberculosis and its risk factors among dairy cattle herds in and around Bahir Dar City, Northwest Ethiopia. *Ethiop. Vet. J.* 19(2): 27-40. <https://doi.org/10.4314/evj.v19i2.3>
- O'Reilly LM, Daborn CJ (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man. A review. *Tuber. Lung. Dis.* 76 Suppl 1: 1-46. [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(95\)90591-X](https://doi.org/10.1016/0962-8479(95)90591-X)
- OIE (2008). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines Bovine Tuberculosis OIE, Paris, PP 683-697.
- Pal M, Zenebe N, Amar T, Woldemariam T (2017). An Abattoir based Study on Bovine Tuberculosis in Debre Zeit, Ethiopia. *World. Vet. J.* 7(3): 101-107. <https://doi.org/10.5455/wvj.20170899>

- Raufu IA, Ameh, JA. (2010). Prevalence of bovine tuberculosis in Maidguri Nigeria -an abattoir study. BAHPA. 58 (2): 119-123. <https://doi.org/10.4314/bahpa.v58i2.62045>
- Rossi G, Aubry P, Dubé C, Smith RL (2019). The spread of bovine tuberculosis in Canadian shared pastures: Data, model, and simulations. Transbound. Emerg. Dis. 66(1): 562-577. <https://doi.org/10.1111/tbed.13066>
- Rossi G, De Leo GA, Pongolini S, Natalini S, Vincenzi S, Bolzoni L (2015). Epidemiological modelling for the assessment of bovine tuberculosis surveillance in the dairy farm network in Emilia-Romagna (Italy). Epidemics. 11: 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2015.02.007>
- Sahraoui N, Mueller B, Yala D, Ouzrout R, Zinsstag J, Boulahbal F, Guetarni D (2008). Investigation about the bovine tuberculosis in two Algerian slaughterhouses. Afr. J. Agric. Res. 3(11): 775-778.
- Sa'idu AS, Mohammed S, Ashafa M, Gashua MM, Mahre MB, Maigado AI (2017). Retrospective study of bovine tuberculosis in Gombe Township abattoir, Northeastern Nigeria. Int. J. Vet. Sci. Med. 5(1): 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.01.003>
- Serrano M, Sevilla IA, Fuertes M, Geijo M, Riscalde MA, Ruiz-Fons JF, Gortazar, C, Juste RA, Domínguez L, Elguezabal N, Garrido JM (2018). Different lesion distribution in calves orally or intratracheally challenged with *Mycobacterium bovis*: implications for diagnosis. Vet. Res. 49(1): 74. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0566-2>
- Talip BA, Sleator RD, Lowery CJ, Dooley JS, Snelling WJ (2013). An Update on Global Tuberculosis (TB). Infect. Dis (Auckl). 6: 39-50. <https://doi.org/10.4137/IDRT.S11263>
- Terefe D (2014). Gross pathological lesions of bovine tuberculosis and efficiency of meat inspection procedure to detect infected cattle in Adama municipal abattoir. J. VMAH. 6(2): 48-53. <https://doi.org/10.5897/JVMAH12.015>
- Traoré A, Tamboura HH, Bayala B, Rouamba DW, Yaméogo N, Sanou M (2004). Prévalence globale des pathologies majeures liées à la production laitière bovine en système d'élevage intraurbain à Hamdallaye (Ouagadougou). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 8 (1) : 3-8.
- Tripathi K, Tripathi PC, Nema S, Shrivastava AK, Dwiwedi K, Dhanvijay AK (2014). Modified Petroff's Method: an excellent simplified decontamination technique in comparison with Petroff's method. IJRTSAT. 10: (3) 461-464.