



Université de Bourgogne Franche-Comté - INRA

Unité Mixte de Recherche 1347 Agroécologie

Ecole Doctorale Environnement - Santé



THESE

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline Sciences de la Vie, Spécialité Ecologie microbienne

**Prévalence de *Mycobacterium bovis* dans les agroécosystèmes :
analyse de réservoirs environnementaux potentiels (sol, eau douce,
faune du sol et faune aquatique) et traçage de la circulation de
cette bactérie entre les différents compartiments**

Présentée et soutenue par

Elodie BARBIER

Le 30 mars 2016

Composition du jury

Alain Hartmann, Directeur de Recherche INRA Dijon, Directeur de thèse

Maria Laura Boschioli, Directrice de Recherche ANSES Maisons-Alfort, Co-Directrice de thèse

Françoise Lucas, Professeur Université Paris Est Créteil (UPEC), Rapporteur

Franck Biet, Directeur de Recherche Tours Nouzilly, Rapporteur

Sylvie Nazaret, Chargée de Recherche CNRS Université Claude Bernard Lyon 1, Examineur

Jaqueline Vialard, Maître de conférence Université Niort ANSES Niort, Examineur

Pascal Simonnet, Directeur de Recherche CNRS Ecole Centrale Lyon, Examineur

Jean-François Cavin, Professeur Université de Bourgogne AgroSup Dijon, Président du jury

Expert invité

Eric Gueneau, Directeur Laboratoire Départemental de la Côte d'Or Dijon, Co-encadrant

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mes encadrants de thèse **Alain Hartmann** et **Maria-Laura Boschioli**. Merci de m'avoir confié ce sujet de thèse passionnant et de votre accompagnement, vos conseils pertinents et vos encouragements tout au long de ces trois années.

Un grand merci **Eric Gueneau**, co-encadrant de ce travail et directeur du Laboratoire Départemental de Côte d'Or, pour son aide et la mise à disposition du P3 pour l'incubation de mes cultures. Je remercie également chaleureusement toute son équipe de choc en microbiologie et biologie moléculaire : **Véronique, Julie, Virginie, et toute l'équipe**.

Je remercie **Françoise Lucas** et **Franck Biet** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'en avoir évalué la pertinence. Merci également à **Sylvie Nazaret, Jaqueline Vialard, Pascal Simonet et Jean-François Cavin** pour leur participation au jury de thèse.

Merci à **Barbara Dufour, Loïc Bollache et Jean-Louis Moyen** pour leur participation au comité de pilotage de thèse et leurs conseils pendant ce travail.

Un énorme merci à la **DDPP21** pour toutes les informations essentielles fournies sur les foyers bovins et la faune sauvage : **Anélise Taconnet, Fabienne Barthélémy, Thierry Grosjean**. Un merci particulier à **Brigitte Biasino** pour son aide précieuse lors d'une campagne de prélèvements fort sympathique.

Des remerciements chaleureux également à **Fabrice Chevalier** et **Marina Béral** de la CIREV Bourgogne pour les données partagées, mais également les magnifiques cartes illustrant mon manuscrit.

Merci aux organismes qui ont contribué financièrement à ce travail, en particulier le **GDS 21**, la **Chambre d'Agriculture de la Côte d'Or**, La **MSA Bourgogne** et la **MSA nationale**, **Interbev** et le **Conseil Départemental de la Côte d'Or**.

Un grand merci à **Violette Sicre** (DDPP16 et Sylvatub) pour son accueil chaleureux et son efficacité lors de mon séjour en Charente. Merci également au directeur du laboratoire de Charente et à son équipe pour leur accueil.

Des remerciements au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon, qui a mis son laboratoire L3 à notre disposition pour l'étude sur la survie de *M. bovis* dans le sol. Merci à **Jean-Marie Duez** pour le temps passé et sa confiance, merci à **Catherine Neuwirth, Julien Bador** et toute l'équipe.

Un grand merci à l'équipe de l'ANSES Maisons-Alfort, notamment **Krystal De Cruz** pour le génotypage des ADN environnementaux, mais également **Claudine Karaoui, Lorraine Michelet et le reste de l'équipe**.

Merci à **Franck Biet** et **Thierry Cochard** de l'INRA de Tours qui nous ont fourni les souches de Map et *M. smegmatis*.

Des énormes remerciements pour les **lieutenants de louveterie, les piégeurs et les chasseurs** qui m'ont accompagnée dans mes prélèvements sur le terrain et sans qui je n'aurais pas pu prélever tous ces échantillons: **Jeannick Gautherot, Dominique Rigaud, Yannick Thibert, Georges Balluet, Jean-Luc Moindrot, Marcel Guillier**, qui connaissent les bois comme leur poche et font un travail considérable.

Je remercie les **éleveurs** qui ont participé au travail en nous accompagnant sur leurs pâtures.

Merci à **Léon Fayolle** pour son expertise sur les lombrics et **Dominique Meunier** pour son expertise sur les formations pédologiques de l'Auxois, merci à **Luc Biju-Duval** pour les cartes réalisées.

Un énorme merci à tous les membres du **pôle MERS** qui ont fait de ces trois années un moment extrêmement riche en échanges scientifiques, humains, amicaux et sportifs...Merci à **Dominique, Pascal, Laurent, Jean-Paul, Sébastien**. Un merci particulier aux filles de l'équipe **Géraldine, Cécile, Laetitia** pour leur gentillesse, leurs compétences et tous les bons moments passés à discuter...et à marcher. Des remerciements tout particuliers à **Murielle Rochelet** pour ses conseils hyper-avisés, sa rigueur, son esprit d'innovation, son anglais parfait et encore plein plein d'autres choses ! Merci infiniment pour tout le temps que tu as passé à me relire et me corriger...

Un grand mais alors très grand merci à **Benoît** sans qui l'expérience lombric n'aurait pas été aussi...exceptionnelle !! Bon courage pour ta thèse. Merci à **Clément** pour les kilos de sols de terriers ramassés, pesés, analysés lors de ces deux stages. Un grand merci à **Pierre** pour sa gentillesse rare, son travail très sérieux et son aide inestimable pour la mise en page, la relecture et l'impression de ce manuscrit.

Merci également à mes collègues du Master AE **Caroline, Alexandre, Fam-Ky, Justin, Marion** et tous les autres, qui m'ont parfois (souvent) aidée à supporter de longues heures de cours.

Merci à tous ceux que j'ai croisé à l'INRA et ailleurs qui ont fait de ces trois ans une expérience humaine et scientifique inoubliable : **Ariane, Emilie, Kadiya, Emeline, Céline, Hélène, Charline, Anne-Laure, Aude, Gilles, David, Marion, Nicolas, Romain, Fabrice, Chloé, Aymé, Laure, Luiz, Marie-Christine, Nadine, Estelle, Amy, Amandine...** et tous ceux que j'ai sûrement oublié.

Enfin pour finir un grand merci à **Stéphane, Lola, Lucien** et **Antonin**, qui ont supporté mes hauts et mes bas pendant ces trois années, à ma **famille** et ma **belle-famille** qui ont toujours été là...

Résumé

La tuberculose bovine est une maladie infectieuse contagieuse causée par *Mycobacterium bovis*. Cette maladie touche les bovins et de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages, ainsi que l'homme. La circulation de la bactérie dans des systèmes multi-hôtes variés favorise l'entretien de la maladie et la contamination des bovins vivant à proximité des animaux sauvages infectés. En marge de la transmission directe de *M. bovis* par voie respiratoire, la transmission indirecte aux bovins, liée à l'inhalation ou à l'ingestion de matrices environnementales contaminées par un animal infecté excréteur, est suspectée dans plusieurs régions du monde. L'existence de réservoirs environnementaux où le bacille *M. bovis* est capable de persister, pourrait donc être un facteur important de la réémergence puis du maintien de la maladie dans les systèmes multi-hôtes.

En Côte d'Or, département fortement touché par la tuberculose bovine depuis 2004, la transmission indirecte de la bactérie entre la faune sauvage infectée et les bovins est suspectée dans plusieurs élevages. Pour évaluer la présence et la survie de cette bactérie dans l'environnement, nous avons analysé un grand nombre d'échantillons prélevés dans des zones partagées par les bovins et/ou la faune sauvage infectés dans le but de déterminer la distribution environnementale de *M. bovis*. Pour ce faire, nous avons développé ou modifié des systèmes de détection moléculaire adaptés aux matrices environnementales complexes. Nous avons également évalué l'impact de la température et des propriétés physico-chimiques de deux sols sur la survie de *M. bovis*, ainsi que le rôle de la mésofaune du sol (lombrics en particulier) dans la dissémination de la bactérie à partir de matière organique contaminée. L'étude environnementale a mis plus particulièrement en évidence la contamination de deux biotopes: les zones humides des pâtures et les sols de terriers de blaireaux. De plus, les études expérimentales ont montré que *M. bovis* pouvait survivre plusieurs mois dans le sol à 4°C et que les lombrics pouvaient disséminer la bactérie dans le sol, voire jouer un rôle potentiel de vecteur pour les animaux qui les consomment. Ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur la persistance et la circulation de *M. bovis* dans l'environnement en Côte d'Or et permettront de proposer des améliorations aux mesures de biosécurité déjà existantes dans les élevages bovins.

Mots clés : *Mycobacterium bovis*, environnement, sol, eau, fèces, bovins, faune sauvage, qPCR, culture

Abstract

Bovine tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*. This disease affects cattle, and many species of domestic and wild mammals, and humans. The circulation of the bacteria in various multi-host systems promotes the maintenance of the disease and the contamination of cattle in the vicinity. Beside direct transmission of the bacteria through the respiratory route, indirect transmission, through inhalation or ingestion of environmental matrices contaminated by an infected animal excretory, is suspected in several countries. Environmental contamination with *M. bovis* appears to be a crucial factor in the persistence of the infection in multi-host systems.

In Côte d'Or, a French department affected by bovine tuberculosis since 2004, the indirect transmission of the bacteria from infected wildlife to cattle is suspected in several cases. To assess this type of transmission of the bacillus, we evaluated the environmental contamination with *M. bovis* on a large number of samples taken in areas shared by cattle and / or wildlife infected. For this purpose, we developed or modified molecular detection systems adapted for environmental complex matrices. We also assessed the impact of physicochemical properties of both soil and temperature on survival of *M. bovis* and the role of earthworms in the spread of the bacteria from contaminated organic material. The environmental study showed the contamination of two media in particular: wetlands pastures and soil badger setts. Moreover, experimental studies have shown that *M. bovis* can survive in soil for several months at 4 ° C and the worms could spread the bacteria in the soil, or even play a potential role for vector animals that consume them. These results will propose improvements to existing biosecurity measures on cattle farms and provide new knowledge about the persistence and circulation of *M. bovis* in the environment in Côte d'Or.

Key words : *Mycobacterium bovis*, environment, soil, water, feces, cattle, wildlife, qPCR, culture

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 - CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
A. LES MYCOBACTERIES : DIVERSITE, PHYLOGENIE, SPECTRE D'HÔTES ET VIRULENCE.....	4
1. <i>Le genre Mycobacterium : taxonomie et méthodes de classification.....</i>	4
2. <i>Caractéristiques générales des mycobactéries.....</i>	5
a. Morphologie des mycobactéries.....	5
b. Caractéristiques culturelles, phénotypiques et physiologiques	7
c. Phylogénie du genre <i>Mycobacterium</i>	8
d. Caractéristiques génétiques des mycobactéries	9
3. <i>Description des différents Complexes ou espèces de mycobactéries.....</i>	10
a. Les mycobactéries non pathogènes potentiellement opportunistes	11
b. Les mycobactéries saprophytes non pathogènes.....	12
c. Les mycobactéries pathogènes obligatoires.....	12
(1) Les mycobactéries responsables de lèpre	12
(2) Les mycobactéries tuberculeuses : le Complexe <i>tuberculosis</i> (MTBC)	13
B. LA TUBERCULOSE : UNE MALADIE TRES ANCIENNE MAIS UNE MENACE TOUJOURS ACTUELLE	20
1. <i>Introduction.....</i>	20
2. <i>Histoire de la tuberculose.....</i>	20
3. <i>La tuberculose bovine.....</i>	21
a. Introduction	21
b. Les hôtes et les communautés d'hôtes de <i>Mycobacterium bovis</i> dans le monde et leurs statuts épidémiologiques	22
c. Aspect zoonotique de <i>Mycobacterium bovis</i>	23
d. Pathogénie de la tuberculose bovine	24
(1) Facteurs influençant le pouvoir pathogène de <i>M. bovis</i> : voies d'infection et dose infectante	24
(2) Facteurs influençant la réceptivité et la sensibilité de l'hôte	25
(3) Les étapes de l'infection et la réponse immunitaire associée	26
(4) Expression clinique de la maladie et lésions observées	27
e. Le dépistage et le diagnostic de l'infection chez les animaux	28
f. Epidémiologie de la tuberculose bovine	30
(1) Evolution de la tuberculose bovine dans le monde et en Europe et mesures de lutte	30
(2) Evolution de la situation sanitaire en France.....	33
(3) Evolution de la situation sanitaire en Côte d'Or	38
C. ECOLOGIE DE <i>M. BOVIS</i> DANS L'ENVIRONNEMENT	42
1. <i>Introduction.....</i>	42
2. <i>Origines de la contamination environnementale par M. bovis.....</i>	42

a.	L'excrétion animale de <i>Mycobacterium bovis</i>	42
b.	Le transfert de <i>Mycobacterium bovis</i> par les effluents d'élevage ou urbains.....	44
3.	<i>Détection et survie de Mycobacterium bovis dans l'environnement</i>	45
a.	Détection de <i>Mycobacterium bovis</i> en conditions naturelles	45
b.	Durées de survie de <i>Mycobacterium bovis</i> en conditions expérimentales	47
4.	<i>Stratégies de survie des mycobactéries dans l'environnement</i>	54
a.	L'état de dormance.....	54
b.	La sporulation.....	55
c.	Interactions des mycobactéries avec la faune du sol	56
d.	Interactions des mycobactéries avec les diptères	57
e.	La formation de biofilms	57
5.	<i>Facteurs de risque de contamination de l'environnement et de transmission de Mycobacterium bovis aux animaux par l'environnement contaminé</i>	58
a.	Risques liés à l'écologie des espèces sauvages sensibles à <i>Mycobacterium bovis</i>	58
b.	Risques liés aux pratiques d'élevage	60
c.	Risques liés aux pratiques cynégétiques	61
d.	Risques liés aux facteurs paysagers, climatiques et pédologiques	62
D.	PRINCIPAUX OUTILS DE DETECTION, DE PHENOTYPAGE ET DE GENOTYPAGE APPLICABLES AU MTBC ET PLUS PARTICULIEREMENT A MYCOBACTERIUM BOVIS	64
1.	<i>La détection des mycobactéries par microscopie</i>	64
2.	<i>Les méthodes de culture des mycobactéries</i>	65
a.	Les différents traitements préalables à la mise en culture des échantillons	65
b.	La culture sur milieu solide	66
c.	La culture en milieu liquide.....	67
3.	<i>Méthodes de détection et d'identification des bactéries du MTBC</i>	68
a.	Caractérisation phénotypique et biochimique des mycobactéries du MTBC.....	69
b.	L'identification des mycobactéries par recherche de biomarqueurs.....	69
c.	L'identification des mycobactéries par des méthodes d'hybridation couplées ou non à la PCR	70
d.	Le séquençage.....	71
e.	Détection et génotypage des mycobactéries du MTBC : les marqueurs utilisés	72
(1)	Les séquences d'insertion	72
(2)	Les courtes séquences d'ADN répétées	73
(3)	Régions de Différence (RD) et Single Nucleotide Polymorphism (SNP)	78
f.	Identification par séquençage complet des génomes.....	79
g.	Méthode spécifique d'identification des mycobactéries animales utilisée par le Laboratoire National de référence de la tuberculose bovine : LNR TB	79
	OBJECTIFS DE LA THESE :	82
	CHAPITRE 2 - DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'OUTILS POUR LA DETECTION DE MYCOBACTERIUM BOVIS DANS LES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX	86
A.	DEVELOPPEMENT D'OUTILS MOLECULAIRES ADAPTES AUX MATRICES ENVIRONNEMENTALES	86

CHAPITRE 3 - ETUDE DE LA PREVALENCE ENVIRONNEMENTALE DE <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> DANS LA ZONE ENDEMIQUE DE TUBERCULOSE BOVINE DE COTE D'OR ET RESULTATS OBTENUS EN CHARENTE	93
A. AVANT-PROPOS	93
B. FIRST MOLECULAR DETECTION OF <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> IN ENVIRONMENTAL SAMPLES FROM A FRENCH REGION WITH ENDEMIC BOVINE TUBERCULOSIS.....	95
C. CAMPAGNES DE PRELEVEMENTS SUPPLEMENTAIRES.....	121
1. <i>Fin des prélèvements en Côte d'Or</i>	121
2. <i>Prélèvements en Charente</i>	123
3. <i>Compléments : paysage, géomorphologie et pédologie</i>	125
D. BILAN GLOBAL	130
CHAPITRE 4 - IMPACT DE LA TEMPERATURE ET DE LA NATURE DU SOL SUR LA SURVIE DE <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> SB0120.....	133
A. AVANT-PROPOS	133
B. EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE IMPACT OF THE TEMPERATURE AND THE SOIL TYPE ON <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> SURVIVAL IN THE ENVIRONMENT.....	135
C. BILAN.....	150
CHAPITRE 5 - ROLE DE LA FAUNE DU SOL DANS LA CIRCULATION DE <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> : ETUDE DE SA DISSEMINATION PAR LES LOMBRICS.....	155
A. AVANT-PROPOS	155
B. RAPID DISSEMINATION OF <i>M. BOVIS</i> FROM CATTLE DUNG TO SOIL BY THE EARTHWORM <i>LUMBRICUS TERRESTRIS</i>	157
C. COMPLEMENT : PRELEVEMENT ET ANALYSE DE LOMBRICS DANS UNE PATURE SUSPECTE.....	174
D. BILAN.....	175
DISCUSSION GENERALE	177
1. <i>Des méthodes développées (ou adaptées) puis validées dans des matrices environnementales</i> .	179
2. <i>Contamination environnementale : les zones humides, les eaux de ruissellement et les sols de terriers sont potentiellement à risque</i>	180
3. <i>Survie et circulation de <i>M. bovis</i> dans l'environnement</i>	183
PERSPECTIVES	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	191
ANNEXES.....	221

Liste des Figures

Figure 1: Structure et composition de l'enveloppe des mycobactéries (d'après Marrakchi, Lanéelle, and Daffé 2014). AG : arabinogalactane, PG : peptidoglycane, TDM : tréhalose dimycolate, PL : phospholipides, TMM : tréhalose monomycolate, GL : glycolipides.....	7
Figure 2: Arbre phylogénique basé sur l'analyse de l'ARNr 16S des principaux complexes et espèces de mycobactéries (d'après Magee et Ward, 2012).	9
Figure 3: Phylogénie des souches du MTBC basée sur les Régions de Différences et différents Single Nucleotide Polymorphism (Dippenaar et al. 2015)	14
Figure 4 : Aspect des colonies de <i>M. bovis</i> sur milieu de Lowenstein-Jensen (à gauche) et Middlebrook 7H11 supplémenté (à droite)	17
Figure 5: Evolution de la réponse immunitaire chez le bovin infecté par <i>M. bovis</i> au cours du temps et aux différents tests de dépistage de la tuberculose bovine (de la Rua-Domenech et al. 2006, adapté de Vordermeier et al. 2004)	27
Figure 6: Carte de distribution de la tuberculose bovine chez les bovins entre juillet et décembre 2014 (Source : WAHID Interface)	31
Figure 7: Statuts des pays européens vis-à-vis de la tuberculose bovine en 2012 et proportion de bovins infectés. OTF : Officially Tuberculosis Free (officiellement indemne de tuberculose bovine), MS : Member State (Etat membre). (Source : EFSA 2014).....	32
Figure 8: Evolution du taux de prévalence annuelle national de la tuberculose bovine chez les bovins (Bénet et al. 2006)	34
Figure 9: Evolution de la prévalence et de l'incidence de la tuberculose bovine en France entre 1995 et 2003 (Cavalerie et al. 2014)	35
Figure 10: Incidence et distribution de la tuberculose bovine en France dans les années 50 (en haut) et entre 2000 et 2013 (en bas) (Cavalerie et al. 2014)	36
Figure 11 : Répartition et résultats des analyses effectuées dans le cadre du dispositif Sylvatub chez le grand gibier d'août 2013 à août 2014 et chez les blaireaux en 2014 (Source Sylvatub)	38
Figure 12 : Localisation du parcellaire des cheptels infectés par la tuberculose bovine entre 2010 et 2015 et spoligotypes incriminés (Source CIREV)	40
Figure 13: Nombre de nouveaux foyers bovins et de foyers recontaminés entre 2002 et 2014 (Données DDPP21)	40
Figure 14 : Nombre de cervidés, sangliers et blaireaux infectés découverts en Côte d'Or entre 2002 et 2014 ...	41
Figure 15 : Représentation schématique de la circulation de <i>M. bovis</i> dans l'environnement agricole (modifié d'après Elliott et al. 2014)	63
Figure 16: Profils de restriction d'isolats de <i>M. tuberculosis</i> obtenus suite à une RFLP-IS6110. Les isolats 3, 5, 6, 9 et 10 ont le même profil et possédaient un lien épidémiologique. S représente le marqueur de poids moléculaire. (Source web: site CDC).	73
Figure 17: Principe du spoligotypage des bactéries du MTBC d'après Kamerbeek et al (1997). A: Représentation du locus DR de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv et <i>M. bovis</i> BCG. B : Amplifications des espaceurs par un couple d'amorces (a et b) et amplicons obtenus. C : Profils d'hybridation sur membrane (un carré noir signale la présence de l'espaceur, les parties blanches leur absence)	75
Figure 18 : Différences génomiques de la région RD1 entre <i>M. bovis</i> BCG (A), <i>M. microti</i> (C) par comparaison à <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (B) d'après Brodin et al. 2002 et localisation du locus Rv3866. RD1 ^{mic} correspond à la séquence de <i>M. tuberculosis</i> délétée chez <i>M. microti</i> . RD1 ^{bcg} correspond à la séquence de <i>M. tuberculosis</i> délétée chez <i>M. bovis</i> BCG.	88

Figure 27: Localisation des communes de Côte d'Or sur lesquelles de foyers bovins et des animaux sauvages infectés ont été détectés et localisation des prélèvements environnementaux effectués en 2015 (les prélèvements positifs sont représentés par des étoiles noires) (Réalisation : Marina Béral, CIREV Bourgogne)	123
Figure 28 : Localisation des communes de Charente sur lesquelles de foyers bovins et des animaux sauvages infectés ont été détectés et localisation des prélèvements environnementaux effectués en 2015 (les prélèvements positifs sont représentés par des étoiles noires) (Réalisation : Marina Béral, CIREV Bourgogne)	125
Figure 29 : Orographie et hydrographie de l'Auxois. Les vallées supportant les parcelles suspectes sont indiquées par une flèche noire (Source BD Carthage et BD alti - IGN)	127
Figure 30 : Localisation de l'Auxois en Côte d'Or, structure paysagère et géomorphologie de ce territoire.....	127
Figure 31 : Nombre de vaches allaitantes par canton dans le département de la Côte d'Or (à gauche) et parcellaire des foyers bovins de 2010 à 2015 (à droite) (Source Recensement agricole 2010 – Agreste).....	128
Figure 32 : Répartition spatiale des parcelles des élevages bovins infectés de 2010 à 2014 en Côte d'Or et représentation des couches pédologiques (Réalisation : Marina Béral, CIREV Bourgogne)	129
Figure 33 : Températures minimales et maximales observées à Dijon-Longvic de 2012 à 2015 (Source Météo France)	151

Liste des Tableaux

Tableau 1: Durées de survie de <i>M. bovis</i> dans différentes matrices environnementales obtenues en conditions expérimentales naturelles ou de laboratoire	49
Tableau 2: Identification des principales mycobactéries du MTBC par des observations phénotypiques et des tests biochimiques.....	69
Tableau 3 : Cibles moléculaires décrites dans la littérature pour la détection du Complexe <i>tuberculosis</i> ou de <i>M. bovis</i> dans les échantillons environnementaux	76
Tableau 4: Spoligotypes et génotypes MIRU-VNTR des souches de <i>M. bovis</i> isolées chez les bovins et la faune sauvage en Côte d'Or et en Dordogne (d'après Hauer et al. 2015).....	77
Tableau 5 : Systèmes de détection utilisés en qPCR en première intention pour l'identification d'une mycobactérie d'origine animale et résultats obtenus.	80

Liste des Annexes

Annexe 1 : Détection de <i>Mycobacterium bovis</i> dans l'environnement : Premiers résultats des recherches menées en Côte-d'Or	223
Annexe 2 : Préparation du Middlebrook 7H9.....	235
Annexe 3 : Préparation du Middlebrook 7H11.....	237

Liste des Abréviations

ADC	Albumine, Dextrose, Catalase
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
AEEMA	Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animales
AFNOR	Agence Française de NORmalisation
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN/RNA	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomique
BAAR	Bacille acido-alcoolique résistant
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bTB	bovine Tuberculosis
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
CFP-10	Culture Filtrat Protein 10 kD
CIREV	Cellules Inter Régionales d'Epidémiologie Vétérinaire
CRISPR	Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats
Ct	Cycle Threshold
DDPP	Direction Départementale de la Protection des Populations
DEFRA	Department for Environment, Food and Rural Affairs
DGAL	Direction Générale de l'ALimentation
DosR	Dormancy Survival Regulator
DR	Direct Repeat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESAT-6	Early Secreted Antigenic Target 6kD
ETR	Exact Tandem Repeat
Fbp	Fibronectin binding protein
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GDS	Groupements de Défense Sanitaire
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IDC	Intradermotuberculation comparative
IDR	Intradermotuberculation
IDS	Intradermotuberculation simple
IFN-γ	Interféron γ
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
Ion PGM	Ion Personal Genome Machine
IS	Insertion Sequence
ITS	Internal Transcribed Spacer
kD/kDa	kilo Daltons
LNR	Laboratoire National de Référence
LSP	Large Sequence Polymorphism

Maa	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
Map	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MDR	Multi Drug Resistant
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MLVA	Multi Locus VNTR Analysis
MNT	Mycobactéries Non Tuberculeuses
MS	Member State
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	Norme Française
NGS	Next Generation Sequencing
OADC	Oleic acid, Albumine, Dextrose, Catalase
OIE	Office International des Epizooties
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONCFS	Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage
ONEMA	Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
OTF	Officially Tuberculosis Free
pb	paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PNA	Peptide Nucleic Acid
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RD	Régions de Différence
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssp	subspecies
TDM	Tréhalose dimycolate
TMM	Tréhalose monomycolate
UFC/CFU	Unité Formant Colonie
VBNC	Viable But Non Cultivable
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
WAHID	World Animal Health Information Database
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization
XDR	eXtensively Drug Resistant

Introduction générale

La tuberculose bovine est une maladie d'importance sanitaire majeure en santé animale à travers le monde. Son agent principal, *Mycobacterium bovis*, est un membre du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*, qui regroupe les bactéries tuberculeuses infectant l'homme et les mammifères. Les bovins constituent le réservoir originel de *M. bovis*, mais de nombreuses espèces de mammifères peuvent également être infectées, dont l'homme. Les enjeux sanitaires, économiques et sociaux induits par cette maladie ont conduit à la mise en place de programmes visant l'éradication de cette maladie chez les bovins à travers le monde. Dans les pays développés, ces mesures, associées à la pasteurisation du lait, ont fortement réduit l'incidence de la tuberculose bovine, voire éradiqué l'infection chez les bovins. Toutefois, dans quelques pays, l'infection persiste dans les cheptels bovins malgré des actions de prévention, de contrôle et de surveillance. Dans les pays en développement, où les contrôles organisés sont quasi- voire totalement absents, la prévalence et la propagation de la tuberculose bovine sont inquiétantes et représentent un risque sanitaire et économique vis-à-vis des populations sensibles. En conséquence, la tuberculose bovine attire chaque année un peu plus l'attention de la communauté internationale en raison du nombre croissant de troupeaux infectés et des effets sur les productions animales, ainsi que du risque que la maladie fait planer sur la santé publique.

Le passage de l'infection du réservoir bovin à différentes populations sauvages, qui entretiennent la maladie et peuvent la transmettre en retour aux bovins, a fortement compliqué les schémas d'éradication de la maladie dans plusieurs régions du monde et explique l'échec partiel des programmes de lutte mis en place. Alors que la transmission directe du bacille par voie respiratoire semble être le mode de transmission prépondérant au sein d'une même espèce, la transmission indirecte de *M. bovis* est fortement suspectée entre espèces partageant les mêmes territoires et ressources, compliquant encore l'épidémiologie de cette maladie.

En France, une recrudescence du nombre de cheptels bovins infectés dans certains départements, dont la Côte d'Or, menace son statut de pays « officiellement indemne de tuberculose bovine » obtenu en 2001. Dans ce département, où plus de 190 foyers bovins ont été détectés depuis 2003, *M. bovis* circule dans un système multi-hôtes incluant les bovins, les cervidés, les blaireaux et les sangliers dans une zone géographique localisée. Face à des contaminations ou des recontaminations inexplicables de cheptels avec des souches identiques à celles retrouvées dans la faune sauvage infectée détectée à proximité dans des élevages, le rôle de l'environnement a été suggéré dans la transmission indirecte du bacille.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse visent à évaluer la contamination environnementale

des zones partagées par les bovins et la faune sauvage infectés grâce à des méthodes adaptées utilisables sur un grand nombre de prélèvements et à rechercher les facteurs favorisant la survie et la circulation de *M. bovis* dans l'environnement. Le premier chapitre de ce manuscrit est une synthèse des connaissances relatives aux mycobactéries en général et aux mycobactéries tuberculeuses en particulier, notamment en terme d'écologie, de détection et d'identification. Le deuxième chapitre détaille le développement des méthodes moléculaires utilisées pour le diagnostic environnemental, ainsi que le développement de deux nouveaux protocoles pour isoler les mycobactéries du sol et suivre leur croissance en milieu liquide. Le troisième chapitre présente les modalités d'étude et les résultats obtenus entre 2013 et 2015 dans l'évaluation de la contamination environnementale en Côte d'Or. Les résultats d'une étude réalisée en Charente sont également présentés. Le quatrième chapitre traite de l'influence de la température et du type de sol sur la durée de survie de *M. bovis*. Enfin, le cinquième chapitre s'intéresse au rôle des lombrics sur la dissémination de *M. bovis* dans le sol. Pour terminer, une discussion générale synthétise l'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail et ouvre de nombreuses perspectives de recherche.

Cette thèse, financée par la Région Bourgogne, entre dans le dispositif Jeunes Chercheurs Entrepreneurs (JCE). Le travail scientifique de recherche s'accompagne de la réalisation d'un Master des Entreprises (Master 2) dans l'objectif d'ouvrir les doctorants au monde de l'entreprise et au développement de projets innovants. Ce Master a été l'occasion pour moi d'acquérir des compétences complémentaires dans le domaine de l'administration et de la gestion des entreprises, notamment dans la gestion de projets. Mon investissement personnel important en parallèle de mon travail de recherche m'a permis d'obtenir le Master avec la mention Bien.

Dans le cadre de la thèse JCE, l'entreprise LSI (spécialisée dans le diagnostic vétérinaire) a accompagné le démarrage de la thèse et m'a permis d'échanger avec des industriels autour du développement de systèmes de détection basés sur la qPCR (IS1561' et autres systèmes). Suite au rachat de l'entreprise par Life Science puis Thermo Fisher, le transfert de technologie n'a pas été poursuivi. Cependant ces systèmes de qPCR sont utilisés en routine par le Laboratoire National de Référence pour la tuberculose bovine encadré par Maria Laura Boschioli pour caractériser les souches de mycobactéries issues d'échantillons animaux. D'autre part, des travaux et résultats obtenus lors de ma thèse vont faire l'objet d'une valorisation sous forme d'un brevet en cours de dépôt pour la détection des mycobactéries et d'un savoir-faire concernant l'extraction des mycobactéries du sol par des méthodes chimiques en vue de leur mise en culture. J'ai donc au cours de mes travaux de recherche toujours conservé l'esprit d'innovation et de transfert potentiel de technologie.

CHAPITRE 1

Contexte bibliographique

CHAPITRE 1 - Contexte bibliographique

A. LES MYCOBACTERIES : DIVERSITE, PHYLOGENIE, SPECTRE D'HÔTES ET VIRULENCE

1. Le genre *Mycobacterium* : taxonomie et méthodes de classification

Les connaissances sur les mycobactéries commencent en 1882, date à laquelle Robert Koch découvre le bacille responsable de la tuberculose humaine, alors baptisé *Bacterium tuberculosis*, et partage son postulat sur l'étiologie infectieuse de la maladie. La coloration de Ziehl et Neelsen développée en 1883 pour la recherche des bacilles acido-alcoolo-résistants permet à Smith en 1892 de mettre en évidence un bacille très proche de *Bacterium tuberculosis* dans des lésions tuberculeuses de bovins, *Mycobacterium bovis*, avec toutefois des différences phénotypiques et pathogéniques qui permettent de distinguer les deux bacilles. Le bacille de la tuberculose aviaire *M. avium* ssp. *avium* est isolé en 1894 sur des oiseaux, puis *M. avium* ssp. *paratuberculosis* en 1895 sur des lésions digestives de bovins. La découverte des premières mycobactéries non tuberculeuses a suivi celle de *Bacterium tuberculosis*, notamment grâce à la coloration. *Mycobacterium smegmatis* a été isolée en 1889 dans des prélèvements biologiques de patients atteints de syphilis, puis dans du beurre par l'équipe de Koch dans les années 1896. Les premières recherches menées dans le sol, les plantes, puis l'eau ont montré que ces substrats pouvaient être des sources de bactéries morphologiquement très proches du bacille de Koch. Le genre *Mycobacterium* (múkês: champignon et baktéria : bâton) est proposé en 1896 par Lehmann et Neumann. Dans les années 50, environ 20 espèces de mycobactéries étaient décrites. Le développement des méthodes de culture, puis des outils moléculaires dans les années 1990 ont permis d'isoler de nouvelles espèces dans des niches environnementales variées, ainsi que chez l'homme et les animaux. A l'heure actuelle, 172 espèces de mycobactéries sont identifiées (Site bacterionet.org).

La diversité phénotypique, physiologique, écologique et pathogénique des espèces placées au fur et à mesure de leur découverte dans ce genre a mené à l'élaboration de plusieurs classifications. Au sein du genre *Mycobacterium*, les espèces sont généralement classées en deux grands groupes : un groupe qui rassemble les mycobactéries pathogènes obligatoires que sont les mycobactéries tuberculeuses et les mycobactéries responsables de la lèpre, et un second groupe qui rassemble les mycobactéries pathogènes opportunistes et saprophytes, appelé mycobactéries atypiques ou mycobactéries environnementales ou mycobactéries non tuberculeuses (MNT).

Dans ces groupes, des complexes d'espèces ont été définis sur des bases d'identité génétique. Le Complexe *tuberculosis* (MTBC) rassemble les mycobactéries tuberculeuses, notamment

M. tuberculosis, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*. Parmi les nombreuses MNT, différents complexes sont observés dont le plus important est le Complexe *Mycobacterium avium* (MAC) qui regroupe quatre sous-espèces distinctes dont trois d'intérêt en santé humaine et animale (*M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* et *M. avium* ssp. *hominisuis*) (Radomski et al. 2010) ainsi qu'une dizaine d'espèces dont *M. intracellulare*.

Plus récemment, la phylogénie moléculaire de ce genre, basée notamment sur l'analyse des gènes de l'ARNr 16S et 23S, ainsi que des réarrangements de gènes, a permis d'affiner la position taxonomique du genre *Mycobacterium*. D'après le Bergey's manual (Ludwig et al. 2008), le genre *Mycobacterium* appartient :

- au Phylum des *Actinobacteria* (bactéries Gram positif, à génome riche en acides nucléiques G et C (%),
 - à la Classe des *Actinobacteria*,
 - à l'Ordre des *Corynebacteriales*, qui regroupe différentes familles de bactéries caractérisées par la présence d'acides mycoliques dans leur paroi et des propriétés tinctoriales particulières liées à la résistance de leur paroi à la décoloration par un mélange alcool-acide (ou BAAR)
 - à la Famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comprend que le genre *Mycobacterium*, caractérisé par une enveloppe riche en acides mycoliques contenant un grand nombre d'atomes de carbone, ainsi que des quinones particulières.

2. Caractéristiques générales des mycobactéries

a. Morphologie des mycobactéries

Les mycobactéries se présentent sous forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés (0,2-0,6 x 1,0-10µm), non mobiles et ne sporulant pas. Les colonies observées sont de couleur blanche à crème, voire jaune à orangée pour les mycobactéries productrices de pigments (Magee & Ward 2012). Elles fixent difficilement la coloration de Gram, et bien qu'elles soient apparentées aux bactéries Gram +, leur qualification exacte est « Bacilles Acido-Alcool-Résistants (BAAR) » car lors de la coloration, leur enveloppe particulière résiste à la décoloration à l'alcool et à l'acide.

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. La mycomembrane est constituée d'acides gras à longue chaîne contenant de 60 à 90 atomes de carbone, les acides mycoliques, qui représentent 30 à 40% de sa masse (Brennan & Nikaido

1995). Dans sa couche interne, les acides mycoliques sont disposés parallèlement les uns aux autres et sont liés au peptidoglycane de façon covalente par l'intermédiaire de la couche d'arabinogalactane (polymère formé d'arabinose et de galactose). Sa couche externe contient des lipides extractibles (ie non fixés de façon covalente au peptidoglycane), tels que le tréhalose monomycolate ou dimycolate, des phospholipides et des glycolipides (Zuber et al. 2008). La mycomembrane est recouverte de glucanes, de protéines et d'une faible proportion de lipides.

Cette enveloppe particulière, très riche en lipides, confère à la bactérie ses propriétés tinctoriales (BAAR), sa grande résistance aux stress chimiques, notamment aux antibiotiques et détergents, aux stress physiques (température), ainsi que biologiques (résistance dans les macrophages de l'hôte et dans les amibes). C'est également un facteur important de virulence chez les mycobactéries pathogènes : certains composants lipidiques possèdent en effet une activité immunogène exceptionnelle (Coulombe et al. 2009). Ils sont capables de moduler l'immunité de l'hôte voire de désorganiser ses mécanismes immunitaires de défense et interviennent dans la pathogénie, comme cela a été démontré pour *M. tuberculosis* et *M. avium ssp. paratuberculosis* (Libero & Mori 2014; Momotani et al. 2012). La paroi est d'ailleurs une des cibles des antimicrobiens utilisés contre la tuberculose humaine ou la lèpre. Ces derniers agissent notamment en inhibant la biosynthèse des molécules qui la constituent. L'utilisation des antigènes lipidiques de la paroi constitue également un axe de recherche pour le développement de vaccins (Libero & Mori 2014).

Dans les matrices environnementales, la paroi hydrophobe des mycobactéries leur permet d'adhérer fortement aux particules en suspension dans l'eau, aux sédiments, aux surfaces, favorisant la formation de biofilms et la survie des bactéries (Primm et al. 2004).

Les acides mycoliques, de par leur complexité et leur variabilité structurale, sont également utilisés comme marqueurs taxonomiques car ils permettent d'identifier avec spécificité le genre et les espèces.

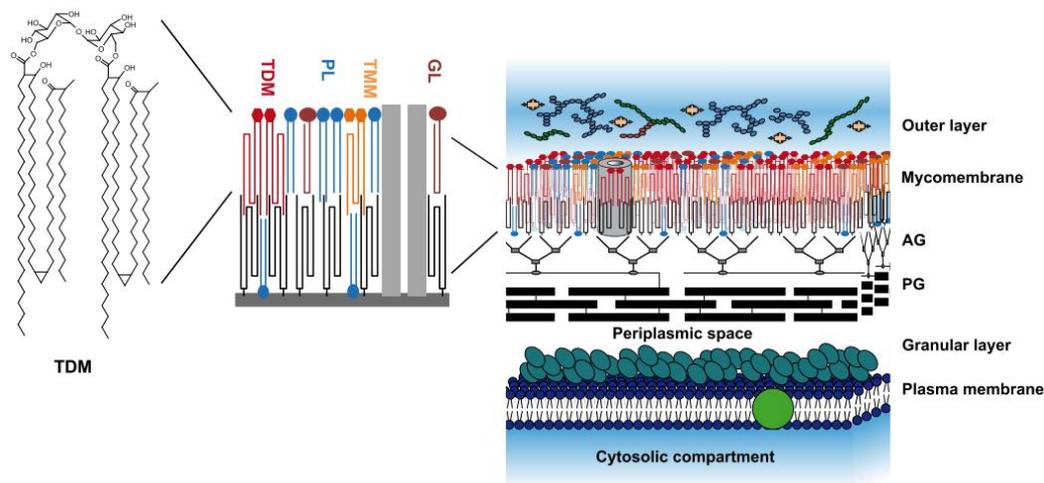


Figure 1: Structure et composition de l'enveloppe des mycobactéries (d'après Marrakchi, Lanéelle, and Daffé 2014). AG : arabinogalactane, PG : peptidoglycane, TDM : tréhalose dimycolate, PL : phospholipides, TMM : tréhalose monomycolate, GL : glycolipides.

b. Caractéristiques culturelles, phénotypiques et physiologiques

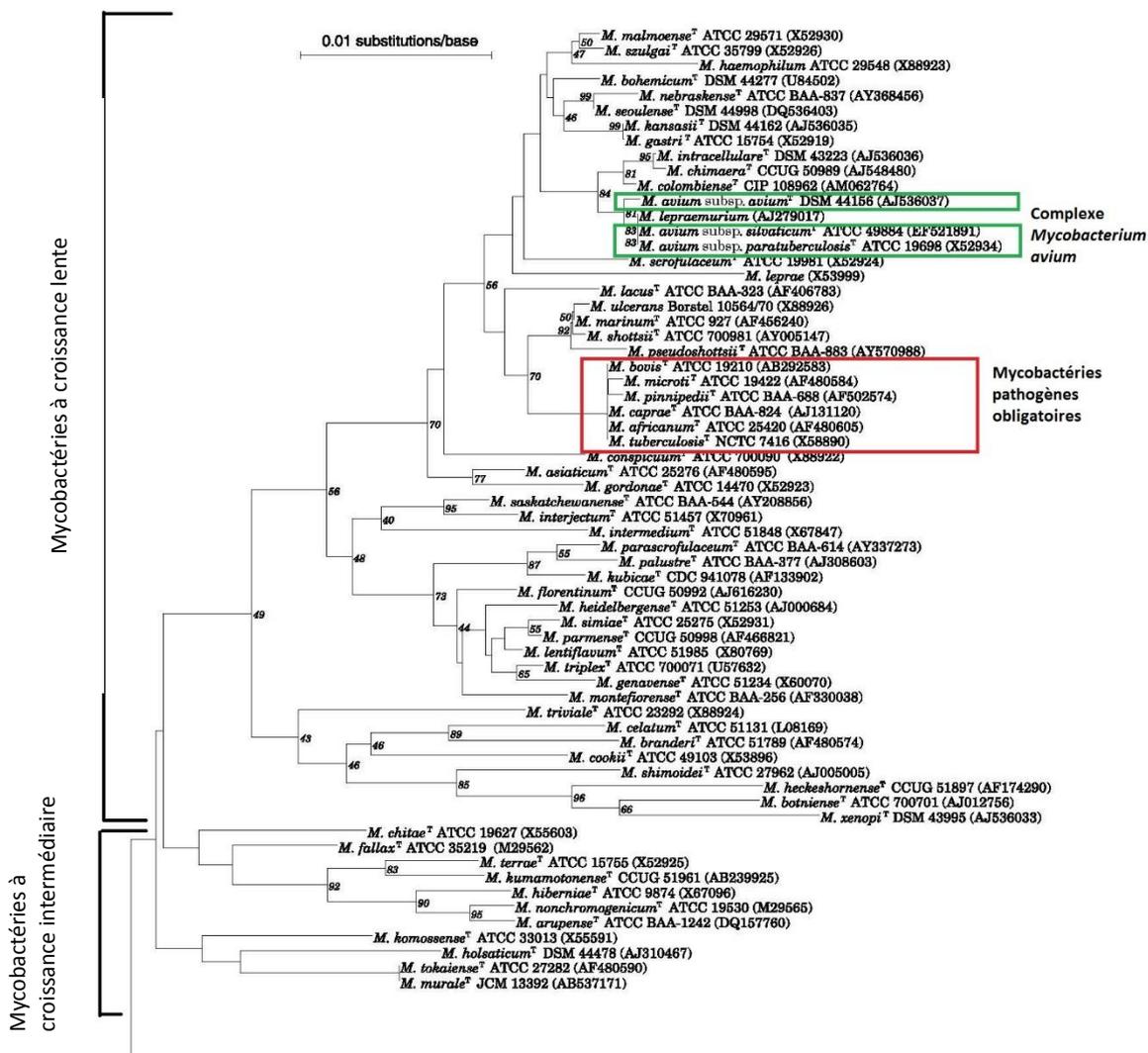
La plupart des mycobactéries sont aérobies strictes, mais quelques espèces tolèrent de faibles pressions d'oxygène, notamment *M. bovis* et *M. tuberculosis*. Les substrats utilisés comme sources de carbone et d'azote varient considérablement entre les espèces et peuvent servir pour leur identification. La majorité des espèces croît sur des milieux de culture classiques, mais pour certaines mycobactéries d'importance clinique, la culture est améliorée par l'utilisation de milieux à l'œuf (Löwenstein-Jensen et Coletsos) après une décontamination chimique ou de milieu Middlebrook, ainsi que par un enrichissement des milieux (en glycérol pour *M. tuberculosis*, en mycobactine pour *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, en hémine pour *M. haemophilum*). Les mycobactéries responsables de la lèpre sont cultivées sur tissus vivants (coussinets de souris, peau de tatou) et se multiplient très difficilement sur milieux synthétiques.

Les mycobactéries ont des vitesses de croissance très variables : on distingue les mycobactéries à croissance rapide dont les colonies sont visibles en moins de 7 jours des mycobactéries à croissance lente (>7 jours). Les bactéries du MTBC sont toutes des mycobactéries à croissance lente avec des temps de génération élevés, de 14 à 15h pour *M. tuberculosis* et environ 20h pour *M. bovis*. La température optimale de croissance des bactéries du MTBC est de 37°C. Les MNT regroupent des mycobactéries à croissance rapide et à croissance lente avec des taux de génération extrêmement variables, allant de 2h pour les bactéries à croissance rapide comme *M. smegmatis* à 21h pour celles à croissance lente comme *M. aurum*, voire 7 jours pour *M. avium* ssp *paratuberculosis* dans des conditions de laboratoire pourtant optimales. Les MNT peuvent se multiplier dans un large éventail de

température allant de 4°C pour *M. psychrotolerans* (Trujillo et al. 2004) à plus de 45°C, voire à 52°C pour *M. thermotolerans* et *M. phlei* (Stahl & Urbance 1990) avec une température optimale de croissance entre 28 et 31°C.

c. Phylogénie du genre *Mycobacterium*

La phylogénie basée sur le polymorphisme de l'ADN codant pour l'ARNr 16S permet de discriminer les espèces de mycobactéries et met en évidence trois grands groupes en fonction de leur vitesse de croissance. Le cladogramme présenté dans la Figure 2 regroupe distinctement les mycobactéries à croissance lente (haut du cladogramme), les mycobactéries à croissance intermédiaire (au milieu) et les mycobactéries à croissance rapide (bas du cladogramme). On peut noter de plus, que les mycobactéries du MTBC et le complexe Mac forment deux groupes phylogénétiquement homogènes au sein du groupe des mycobactéries à croissance lente.



énergétique, la biosynthèse des acides aminés et des cofacteurs et le métabolisme des nucléotides et des protéines (Marri et al. 2006). Des plasmides ont été mis en évidence chez quelques espèces de mycobactéries environnementales (Rauzier et al. 1988; Stinear et al. 2004), notamment le plasmide pMUM001 isolé chez *M. ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli chez l'homme, qui code pour un macrolide aux propriétés cytotoxiques et immunosuppressives, la mycolactone (Stinear et al. 2004).

Le nombre d'opérons ribosomiaux 16S dans le génome des mycobactéries a été suggéré comme l'un des facteurs expliquant la différence des vitesses de croissance observées. La croissance lente des mycobactéries serait liée à la présence d'un seul opéron ribosomal, les espèces à croissance rapide en possédant généralement deux (*rrnA* et *rrnB*) (Bercovier et al. 1986). Toutefois des exceptions existent et d'autres facteurs tels que la lenteur des échanges à travers leur paroi imperméable riche en lipides et le coût énergétique élevé de la synthèse de leurs acides gras à longues chaînes seraient également impliqués (Primm et al. 2004).

Dans le Complexe *tuberculosis*, les différentes espèces constituent un modèle d'identité génétique interspécifique. Leurs génomes présentent une identité supérieure à 99,9% au niveau nucléotidique et des séquences d'ARNr 16S et d'ITS identiques (Böddinghaus et al. 1990; Sreevatsan & Pan 1997; Huard et al. 2006; Cole et al. 1998; Garnier et al. 2003; Kasai et al. 2000). L'analyse des séquences de 56 gènes de structure de plusieurs centaines d'isolats d'origines géographique et phylogénétique variées suggère que le polymorphisme allélique est exceptionnel dans ce Complexe (Sreevatsan & Pan 1997; Musser et al. 2000). La recombinaison de très petits fragments d'ADN est démontrée chez *M. tuberculosis* (Namouchi et al. 2012), mais le transfert latéral de gènes ne semble pas être un facteur important dans l'évolution des bactéries du MTBC qui ont une structure de population fortement clonale (Pepperell et al. 2013), contrairement à la plupart des autres bactéries pathogènes. Malgré leur forte identité génétique, les espèces du Complexe se différencient par des régions polymorphiques ou LSPs (Large Sequence Polymorphisms) liées à des délétions et à des réarrangements de séquences (Brosch et al. 2002; Huard et al. 2003). Parmi ces LSPs, 14 Régions de Différence ou RD de 2 à 12,7 kpb sont recensées dans le MTBC. Ces délétions sont considérées comme une adaptation évolutive à l'infection de nouveaux hôtes, plutôt qu'à une dérive génétique (Brodin et al. 2002; Aranaz et al. 2003). Cette variabilité génomique permet à la fois de différencier les espèces entre elles (Huard et al. 2003; Huard et al. 2006) et de retracer leur évolution phylogénétique (Rodriguez-Campos et al. 2014).

3. Description des différents Complexes ou espèces de mycobactéries

Alors que les mycobactéries responsables de la tuberculose et de la lèpre sont des pathogènes obligatoires, les MNT rassemblent des mycobactéries saprophytes sans pouvoir pathogène jusque-là

avéré et des mycobactéries pathogènes opportunistes responsables de mycobactérioses humaines ou animales. Depuis la fin du 19^{ème} siècle jusqu'aux années 1950, la tuberculose humaine représentait un tel problème de santé publique que toutes les études étaient centrées sur elle et son agent, *M. tuberculosis*. Les autres mycobactéries isolées dans l'environnement ou dans des prélèvements biologiques humains et animaux étaient considérées comme des bactéries saprophytes sans intérêt clinique particulier. A partir des années 1950, la communauté scientifique a admis la responsabilité indiscutable de certaines mycobactéries environnementales dans des processus pathologiques humains et animaux appelés mycobactérioses amorçant des études les concernant. En l'absence de contamination inter-humaine démontrée, il a été admis que l'origine de ces mycobactéries est environnementale et que l'homme se contamine à partir de l'environnement .

a. Les mycobactéries non pathogènes potentiellement opportunistes

Elles regroupent les mycobactéries environnementales qui présentent un pouvoir pathogène pour l'homme et les animaux, très variable en fonction des espèces (van Ingen et al. 2009; Tortoli 2003). L'incidence des infections humaines liées à des mycobactéries opportunistes semble augmenter dans les pays industrialisés (Falkinham 2016), peut-être en lien avec l'amélioration des outils pour les isoler et les identifier. Les mycobactérioses qu'elles engendrent surviennent généralement sur un terrain d'immunodépression locale ou générale. Chez l'homme, elles sont responsables d'un large éventail de symptômes cliniques, majoritairement des infections pulmonaires, mais également des lymphadénites chez les enfants, des infections cutanées (notamment liées à *M. marinum* responsable du granulome des piscines et *M. ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli), des infections extra-pulmonaires voire des infections disséminées chez les patients sévèrement immunodéprimés (van Ingen 2013; Biet et al. 2005; Hoefsloot et al. 2013). Environ 25 espèces sont retrouvées régulièrement dans les échantillons cliniques, les autres beaucoup plus rarement (van Ingen 2013). Parmi elles, les mycobactéries à croissance lente semblent plus prédisposées à provoquer des atteintes pulmonaires ou lymphatiques, alors que celles à croissance rapide affectent plutôt la peau, les os et les articulations (Tortoli 2003, 2009). Les mycobactéries *M. avium* et *M. intracellulare* sont les plus fréquemment isolées chez l'homme, majoritairement en cas d'atteinte pulmonaire (Hoefsloot et al. 2013; Whiley et al. 2012). La distribution des espèces pathogènes isolées chez l'homme diffère selon la zone géographique étudiée, probablement en lien avec leurs niches écologiques (Hoefsloot et al. 2013).

Chez les animaux, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (Map) est l'agent de la maladie de Johne ou paratuberculose chez les ruminants domestiques et sauvages, les primates, ainsi que d'autres espèces (lapins, etc.), chez qui elle provoque une entérite chronique contagieuse et incurable, à l'origine de pertes économiques importantes dans les cheptels infectés. Son rôle est également évoqué dans la

maladie de Crohn chez l'homme (Biet et al. 2005; Rowe & Grant 2006; Momotani et al. 2012) sans toutefois que la causalité ait été démontrée. *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (Maa) est responsable de la tuberculose aviaire chez les oiseaux et les petits mammifères terrestres chez qui elle provoque des lésions tuberculeuses majoritairement digestives, des lymphadénites et des infections disséminées (Biet et al. 2005; Pavlik et al. 2000). *Mycobacterium avium* ssp. *hominissuis* (Mah) est responsable de lésions des nœuds lymphatiques et de différents organes chez le porc (Pavlik et al. 2000).

b. Les mycobactéries saprophytes non pathogènes

Parmi toutes les mycobactéries environnementales décrites à l'heure actuelle, certaines sont retrouvées uniquement dans l'environnement et n'ont jamais été isolées chez l'homme ou l'animal, comme *M. arabiense* ou *M. rufum* (Tortoli 2014). Ces mycobactéries sont dites saprophytes. Parmi elles, certaines ont été isolées dans des sols et des sédiments fortement pollués par les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) qu'elles sont potentiellement capables de dégrader (Hennessee et al. 2009; Leys et al. 2005; Hormisch et al. 2004). Elles représentent donc une voie intéressante pour la bioremédiation de ces sols.

c. Les mycobactéries pathogènes obligatoires

(1) Les mycobactéries responsables de lèpre

Les mycobactéries responsables de la lèpre humaine et murine sont *M. leprae*, *M. lepromatosis* et *M. lepreaemurium*. Elles provoquent des infections dermatologiques et nerveuses chroniques graves et mutilantes, parfois mortelles. *Mycobacterium leprae* touche environ 1,5 million de personnes dans le monde et la maladie reste un problème de santé publique préoccupant dans les zones endémiques d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du sud (Who 2014). *Mycobacterium leprae* a longtemps été considérée comme un pathogène obligatoire de l'homme avec une voie de transmission interhumaine majoritaire. La découverte de réservoirs animaux (Truman 2005; Meredith et al. 2014) et la détection de *M. leprae* dans le sol, la sphaigne ou l'eau de rivière (Matsuoka et al. 1999; Mostafa et al. 1995; Lavana et al. 2006) tendent à souligner le rôle potentiel de certains animaux ou de l'environnement comme source de l'infection chez l'homme. Ces 3 espèces sont multipliées sur les coussinets de souris (Shepard 1960) et sur la peau de tatous à 9 bandes (*Dasyus novemcinctus*) (Kirchheimer & Storrs 1971), car aucun milieu synthétique ne permet leur croissance optimale.

(2) Les mycobactéries tuberculeuses : le Complexe *tuberculosis* (MTBC)

Toutes les mycobactéries tuberculeuses sont des pathogènes obligatoires. Contrairement aux mycobactéries environnementales, leur croissance dans l'environnement n'a jamais été démontrée. Le complexe *tuberculosis* comprend à ce jour 13 espèces, qui malgré une forte identité génétique, présentent des phénotypes, des hôtes et des pouvoirs pathogènes variés.

- Phylogénie des mycobactéries du MTBC

L'étude des RD évoquées précédemment et des mutations à l'échelle du nucléotide (ou SNP : Single Nucléotide Polymorphism) sur 7 gènes (*katG*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *mmpL6*, *oxyR* et ADNr 16S) ont permis de retracer la phylogénie des bactéries du Complexe à partir de leur ancêtre commun (Brosch et al. 2002; Rodriguez-Campos et al. 2014; Gordon et al. 1999; Mahairas et al. 1996; Huard et al. 2003), les délétions et mutations jouant un rôle d'horloge moléculaire permettant de replacer l'apparition et l'évolution d'une espèce dans le temps. Le scénario de l'évolution des bactéries du MTBC est schématisé dans la Figure 3. Selon les auteurs, l'ancêtre du MTBC appelé *M. protuberculosis* aurait émergé il y a entre 15 000 et 40 000 ans en Afrique de l'Est (Gutierrez et al. 2005; Wirth et al. 2008; Sreevatsan & Pan 1997). A côté de *M. canetti*, la bactérie du MTBC génétiquement la plus proche de l'ancêtre, deux clades principaux peuvent être observés. Un clade de souches spécifiques de l'homme, caractérisé par la délétion TbD1, a donné les différentes lignées modernes de *M. tuberculosis* (Figure 3). 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*) et d'animaux (le Chimpanzee bacillus, *M. mungi*, le Dassie bacillus et *M. suricattae*), ainsi que des souches adaptées à différentes espèces de mammifères (*M. orygis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* et *M. bovis*).

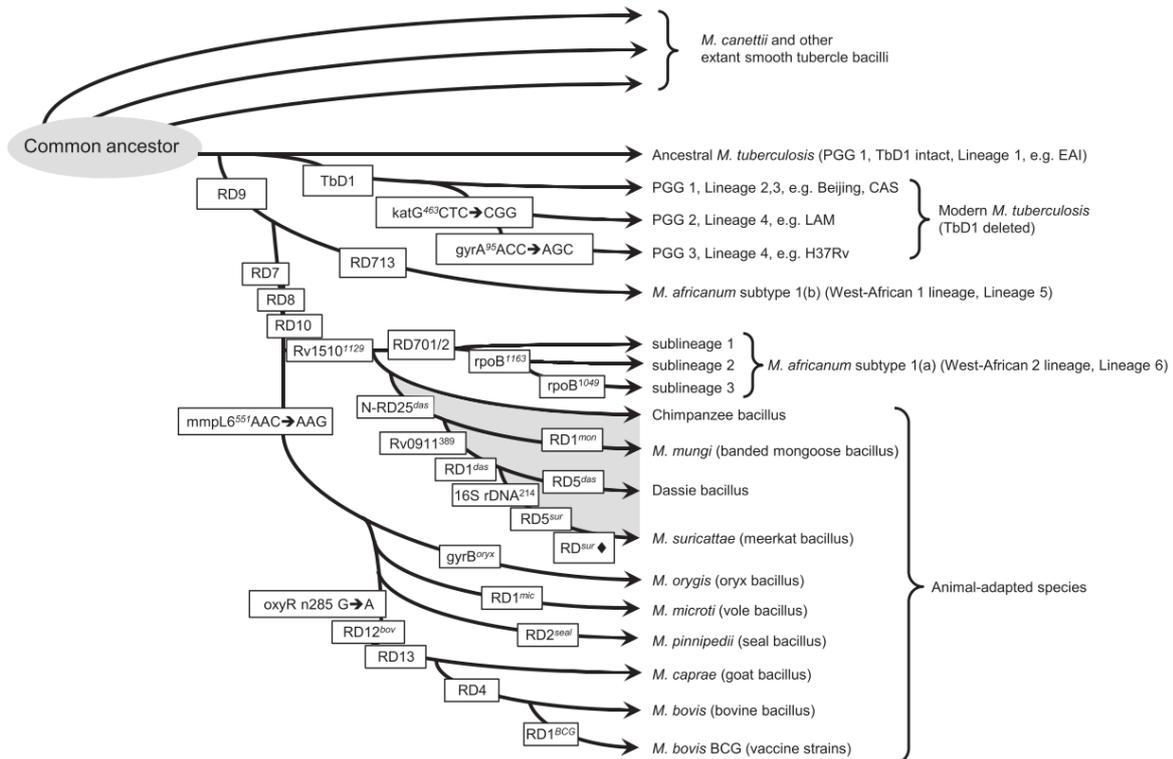


Figure 3: Phylogénie des souches du MTBC basée sur les Régions de Différences et différents Single Nucleotide Polymorphism (Dippenaar et al. 2015)

- Virulence des mycobactéries du MTBC

Les mycobactéries du MTBC ne possèdent pas de facteurs de virulence classiques, tels que les toxines par exemple, observés chez d'autres bactéries pathogènes. Pour certains auteurs, la virulence des mycobactéries est restreinte à l'aptitude du bacille à pénétrer dans l'hôte, à y survivre et s'y multiplier (Pollock & Neill 2002). De façon plus large, la notion de virulence chez les membres du MTBC a été conceptualisée comme l'association de i) la capacité de la bactérie à faire face à la réponse immunitaire de l'hôte infecté, ii) la capacité à engendrer des lésions, iii) la capacité à survivre en dehors de son hôte, notamment lors de l'aérosolisation et iiiii) la transmission et l'infection d'un nouvel hôte (Coscolla & Gagneux 2014). La virulence implique donc un ensemble de mécanismes complexes et variés faisant intervenir de nombreux gènes et protéines permettant notamment au bacille de pénétrer dans les cellules de l'hôte et d'y survivre en bloquant les différents mécanismes de défense des macrophages (inhibition de la fusion phagosome-lysosome et de la production de ROS¹ et RNS², désorganisation de l'immunité de l'hôte, inhibition de l'autophagie et de l'apoptose) (Hmama et al.

¹ ROS : Reactive Oxygen Species

² RNS : Reactive Nitrogen Species

2015). Plus de cent gènes seraient impliqués dans la virulence des bactéries du MTBC et l'utilisation de mutants permet peu à peu de connaître le rôle de chacun (Forrellad et al. 2013). L'analyse du transcriptome (ARN) de *M. tuberculosis* au cours de l'infection de macrophages et de cellules dendritiques a révélé l'expression ou la surexpression de nombreux gènes codant des protéines intervenant notamment dans le métabolisme lipidique, la synthèse de l'enveloppe bactérienne, l'approvisionnement en fer, la résistance au stress oxydatif et l'inhibition de l'apoptose (Mukhopadhyay et al. 2012). Les mécanismes de survie en dehors de l'hôte sont inconnus à ce jour.

Il a été montré chez *M. tuberculosis* qu'en fonction des lignées ou des souches, la virulence pouvait varier, entraînant une réponse immunitaire réduite ou retardée chez l'hôte, une plus grande sévérité de la maladie et une transmission augmentée (Coscolla & Gagneux 2014). Ce lien souche-virulence est également suspecté chez *M. bovis* pour lequel certains génotypes s'accompagnent d'un plus grand nombre d'animaux à lésions et /ou d'un score lésionnel plus élevé (Wright et al. 2013; Gavier-Widén et al. 2009; Garbaccio et al. 2014), mais des études complémentaires restent nécessaires.

- Les mycobactéries spécifiques de l'homme

***Mycobacterium tuberculosis* :**

Mycobacterium tuberculosis est l'agent de la tuberculose humaine, maladie retrouvée dans toutes les régions du monde. C'est un problème majeur de santé publique puisque 2 milliards d'individus seraient infectés dans le monde. En 2013, l'OMS a évalué à neuf millions le nombre de nouveaux cas annuels et à un million et demi le nombre de décès liés à la tuberculose (dont 24% de personnes séropositives). Les régions de l'Asie du sud-est et du Pacifique occidental regroupent 56% des nouveaux cas, l'Afrique 25%, l'Inde 24% et la Chine 11% (WHO 2014). L'infection par le HIV est un facteur prédisposant majeur dans la transmission de la maladie et la progression de l'infection chez l'homme, de par les effets synergiques délétères des 2 micro-organismes sur le système immunitaire (Pawlowski et al. 2012). Environ 78% des personnes co-infectées vivent en Afrique (WHO 2014). La tuberculose se manifeste chez l'homme par des granulomes pulmonaires (tuberculose pulmonaire) mais peut se développer dans d'autres organes (tuberculose extra-pulmonaire). Elle se transmet essentiellement par voie respiratoire, par l'inhalation de gouttelettes contaminées émises par une personne infectée, lors de toux par exemple. Le traitement repose sur l'association de plusieurs antibiotiques adaptés, tels que l'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol.

L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques MDR (Multi Drug Resistant) et XDR (eXtensively Drug Resistant) constitue à l'heure actuelle un problème majeur dans la lutte contre la maladie. Bien que l'homme constitue le réservoir majeur de la bactérie, *M. tuberculosis* été isolée chez

un grand nombre d'espèces animales telles que les bovins domestiques (Romero et al. 2011; Prasad et al. 2005; Ameni et al. 2011; Pavlik et al. 2005; Cadmus et al. 2006), les chèvres (Cadmus, Adesokan, et al. 2009), les porcs domestiques (Jenkins et al. 2011), les chiens (Pavlik et al. 2005), les oiseaux et des animaux de zoos (Michel et al. 2003), dont les éléphants.

***Mycobacterium africanum* :**

Elle est principalement retrouvée dans les pays d'Afrique de l'ouest où elle peut être impliquée dans la moitié des cas de tuberculose humaine, à côté de *M. tuberculosis* (de Jong et al. 2010). Isolée et décrite pour la première fois au Sénégal en 1968, elle présente des caractéristiques biochimiques variables, intermédiaires entre celles de *M. tuberculosis* et *M. bovis* (Castets & Sarrat 1968). *Mycobacterium africanum* est parfois isolée chez l'homme en dehors de l'Afrique (Schröder 1982; Grange & Yates 1989; Desmond et al. 2004; Frottier et al. 1990). La proximité phylogénétique de *M. africanum* avec les autres membres du MTBC infectant des espèces animales a soulevé la question d'un réservoir animal de la bactérie. Mais elle a été isolée de façon sporadique sur des singes (Thorel 1980), des bovins (Rahim et al. 2007; Cadmus et al. 2006) et du lait (Cadmus et al. 2010), infirmant cette hypothèse.

***Mycobacterium canetti* et smooth tubercle bacilli :**

Elle est responsable de tuberculose humaine dans une zone géographique confinée à la corne de l'Afrique (Djibouti, Somalie, Kenya) (Pfyffer et al. 1998; Miltgen et al. 2002). Elle est la plus proche génétiquement de l'ancêtre des bactéries du MTBC. Elle constitue un taxon divergent des autres membres du MTBC par son phénotype particulier et son génotype qui présente une large diversité génétique et des signes de transfert horizontal et de recombinaison de gènes contrairement aux autres bactéries du MTBC (Fabre et al. 2004; Supply et al. 2013; Gutierrez et al. 2005). Sa situation géographique confinée, la grande diversité génétique des souches rencontrées et le manque de connaissances sur la transmission de la bactérie ont suggéré l'existence d'un réservoir environnemental (Fabre et al. 2004; Koeck et al. 2011). A ce jour, cette hypothèse n'a pas été confirmée. La tuberculose à *M. canetti* est considérée aujourd'hui comme une maladie émergente.

- Les mycobactéries spécifiques des animaux

***Mycobacterium bovis* :**

Mycobacterium bovis est l'agent de la tuberculose bovine, maladie présente sur tous les continents. Les bovins constituent le réservoir naturel du bacille, mais un grand nombre d'espèces

animales domestiques et sauvages peuvent être infectées, ainsi que l'homme (Biet et al. 2005; Palmer 2013; Grange & Yates 1994; O'Reilly & Daborn 1995). Sur le plan microbiologique, *M. bovis* se caractérise par une croissance très lente sur milieu de Löwenstein-Jensen (6 à 10 semaines), par des colonies petite taille (1 à 2 mm), plates, lisses « dysgoniques » et achromogènes. Sa croissance est améliorée par l'ajout de pyruvate et inhibée par l'ajout de glycérol. Sur Middlebrook 7H11, les colonies sont rugueuses et à bords échancrés (Figure 4). Le pH optimum de culture de *M. bovis* est compris entre 5,8 et 6,9, mais la bactérie survit 20 jours dans du yaourt à 4°C (Mitscherlich & Marth 2012). L'identification phénotypique repose notamment sur l'absence de production de niacine, l'absence de nitrate réductase, une résistance au pyrazinamide, à la D-cyclosérine (30mg.mL⁻¹) et une croissance favorisée par la présence de pyruvate (Delaune et al. 2012).

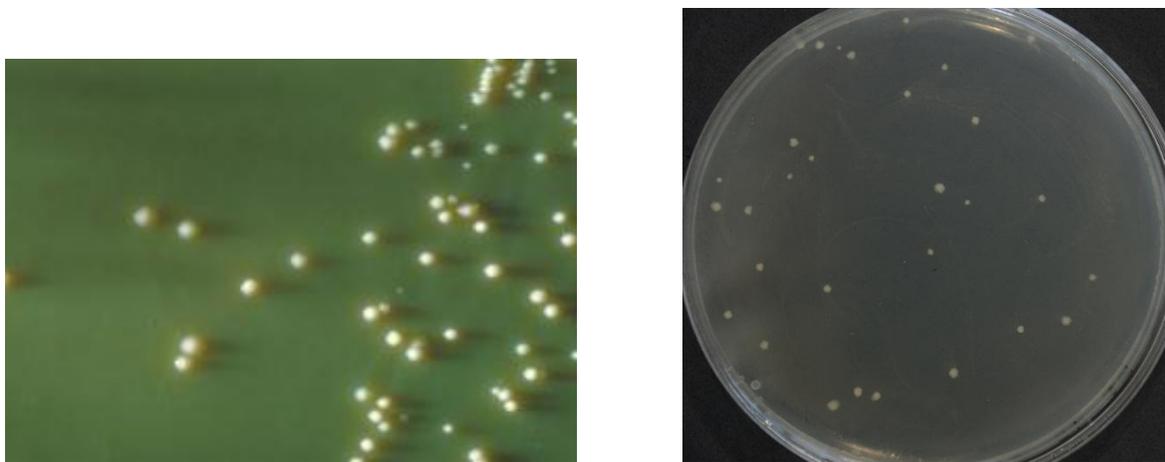


Figure 4 : Aspect des colonies de *M. bovis* sur milieu de Lowenstein-Jensen (à gauche) et Middlebrook 7H11 supplémenté (à droite)

Concernant les caractéristiques génomiques de *M. bovis*, le séquençage complet de la première souche (*M. bovis* AF2122/97 ou ATCC BAA-935 isolée d'une lésion caséuse de bovin en Grande-Bretagne) en 2003 et son annotation ont enrichi les connaissances sur ce bacille. Son génome comprend 4,345 Mpb, un pourcentage G-C élevé de 65,6% et 3952 gènes codant des protéines, dont 1 prophage et 42 séquences d'insertion. Il présente 11 délétions de 1 à 12,7 kb par comparaison avec le génome de *M. tuberculosis* H37Rv et 1 locus absent chez *M. tuberculosis* appelé TbD1 (Garnier et al. 2003). Ne possédant pas de gènes propres à l'espèce *bovis*, le génome de *M. bovis* a été façonné par l'apparition de ces délétions conditionnant l'expression des gènes. Depuis 2003, une quarantaine de souches isolées sur des animaux domestiques et sauvages ont été entièrement séquencées (Sites : NCBI et European Nucleotide archive).

La structure de la population de *M. bovis* résulte de l'expansion de plusieurs complexes clonaux issus d'un même ancêtre. Quatre complexes clonaux majeurs ont été identifiés dans le monde pour

M. bovis en se basant sur la présence de délétions chromosomiques caractéristiques dans le génome de la bactérie et/ou sur des SNPs ainsi que sur le spoligotype et l'absence de certains spacers (Smith 2012) : le Complexe African 1 est retrouvé dans plusieurs pays africains (Mali, Cameroun, Nigéria, Tchad) (Müller et al. 2009), le Complexe African 2 est essentiellement retrouvé chez les bovidés d'Afrique de l'Est (Berg et al. 2011), le Complexe European 1 est retrouvé en Europe, il est dominant au Royaume-Uni, et beaucoup plus rare en Espagne, au Portugal et en France. On le retrouve également chez les anciens partenaires commerciaux du Royaume-Uni (USA, Afrique du Sud, Nouvelle Zélande, Australie, Canada) et en Amérique du sud. La diffusion géographique de ce Complexe est liée aux échanges commerciaux de bovins (Smith et al. 2011). Enfin, le Complexe European 2 est majoritaire au Portugal et en Espagne et assez fréquent en France et en Italie (Rodriguez-Campos et al. 2012). D'autres complexes clonaux minoritaires existent. En France, plusieurs complexes clonaux coexistent, certains autochtones évoluent depuis longtemps sur le territoire, alors que d'autres ont été importés à la faveur des échanges commerciaux de bovins (Hauer et al. 2015).

Une souche atténuée obtenue à partir d'un isolat virulent de *M. bovis* a été créée par Calmette et Guérin après 230 repiquages sur un milieu bilié enrichi en glycérol entre 1908 et 1921, le BCG, pour Bacille de Calmette et Guérin. Testée sur des modèles animaux, cette souche atténuée immunisait contre une infection expérimentale à *M. bovis* et *M. tuberculosis* trente jours après injection. Utilisée pour la vaccination, elle a été distribuée dans le monde entier et maintes fois repiquée, ce qui a mené à une évolution de la souche initiale en plusieurs souches très hétérogènes. La comparaison génomique de la souche BCG avec *M. tuberculosis* révèle la perte de 14 régions (RD1 à RD14) chez BCG. L'absence de la région RD1 expliquerait en partie l'atténuation du BCG (Pym et al. 2002), toutefois comme la réintroduction de RD1 dans une souche mutante ne suffit pas à restaurer totalement la virulence, d'autres régions sont impliquées dans l'atténuation (Brosch et al. 2007).

***Mycobacterium pinnipedii* :**

Découverte en 1986, cette mycobactérie touche principalement les différentes espèces de phoques et les lions de mer sauvages de l'hémisphère sud ou en captivité. Elle a été isolée en Australie, Nouvelle-Zélande, Uruguay, Argentine et Grande-Bretagne (Cousins et al. 2003). Des infections chez l'homme ont été rapportées, principalement chez les soigneurs en contact avec les animaux malades en captivité (Kiers et al. 2008). La transmission indirecte du bacille par inhalation d'aérosols lors du nettoyage des enclos est fortement suspectée.

***Mycobacterium caprae* :**

Cette mycobactérie du MTBC a été isolée pour la première fois sur des chèvres en Espagne (Aranaz et al. 1999; Aranaz et al. 2003). C'est l'un des agents de la tuberculose bovine, avec *M. bovis*,

et elle induit des lésions identiques à la tuberculose à *M. bovis* chez les animaux infectés. La tuberculose à *M. caprae* touche principalement l'Europe où elle a déjà été détectée en Espagne (Rodríguez et al. 2011), en France (Haddad et al. 2001), en Autriche (Prodinger et al. 2002), en Allemagne (Kubica et al. 2003), et dans plusieurs pays d'Europe centrale (Pavlik et al. 2005; Beširović et al. 2012; Cvetnic et al. 2007). Le nombre de cas détectés tend à augmenter chez les bovins et les animaux sauvages, notamment en Espagne, en Allemagne, en Autriche (Rodríguez et al. 2011; Schoepf et al. 2012). En Europe centrale, elle représente l'agent principal de la tuberculose bovine, notamment en République Tchèque, Slovaquie, Bosnie Herzégovine et Croatie où elle circule entre les bovins et de nombreuses espèces sauvages (Prodinger et al. 2005; Beširović et al. 2012). Elle a également été isolée pour la première fois en Chine en 2013 (Zeng et al. 2013). C'est également un agent zoonotique important puisque des infections à *M. caprae* sont rapportées chez l'homme dans différents pays d'Europe ((Kubica et al. 2003; Prodinger et al. 2014; Prodinger et al. 2002; Müller et al. 2013).

***Mycobacterium microti* :**

Cette mycobactérie est l'agent responsable de la tuberculose des petits rongeurs (campagnols, souris, musaraignes, ...) chez qui elle a été isolée dans les années 30 (Wells 1937; Wells & Robb-Smith 1946). Elle a été isolée chez plusieurs espèces de mammifères, dont des chats (Gunn-Moore et al. 1996; Gunn-Moore et al. 2011), des bovins (Jahans et al. 2004), des porcs (Taylor et al. 2006), des lamas, des blaireaux (Smith et al. 2009), des sangliers (Dondo et al. 2007), des suricates (Palgrave et al. 2012). En France, la détection de *M. microti* chez des animaux domestiques et sauvages a suggéré que la bactérie était endémique dans certaines régions de France (Michelet et al. 2015; Laprie et al. 2013). Chez l'homme, une trentaine de cas d'infections à *M. microti*, principalement à localisation pulmonaire, ont été reportés dans la littérature entre 2000 et 2010 (Panteix et al. 2010). Bien que les personnes immunodéprimées soient les plus touchées, l'infection se rencontre également chez des sujets immunocompétents (Niemann et al. 2000; Frank et al. 2009).

***Mycobacterium orygis* :**

Isolée pour la première fois en 1976 sur des oryxes en Afrique de l'est (Lomme et al. 1976), elle a été isolée dans de rares occasions sur d'autres espèces de ruminants, tels que les gazelles, les antilopes (Van Soolingen et al. 1994), les buffles africains (van Pittius et al. 2012) en Afrique du sud, dans la Péninsule arabe et dans des zoos des Pays Bas et du Royaume Uni.

Des infections à *Mycobacterium orygis* ont été rapportées chez une dizaine de patients humains (Dawson et al. 2012; van Ingen et al. 2012).

Autres mycobactéries à réservoir animal :

Quatre autres espèces de mycobactéries animales phylogénétiquement proches de *M. africanum* West African 2 ont été isolées sur des animaux en Afrique : le *Chimpazee bacillus* isolé sur un chimpanzé de Côte d'Ivoire (Coscolla et al. 2013), *M. mungji* isolée sur des mangoustes rayées (*Mungos mungo*) du Botswana (Alexander et al. 2010), le *Dassie bacillus* isolé sur un daman du Cap (*Procavia capensis*) (Wagner et al. 1958) et *M. suricattae* isolée sur des suricates (*Suricata suricatta*) en Afrique du sud (Parsons et al. 2013). Ces espèces n'ont à ce jour jamais été isolées chez l'homme. La découverte récente de ces espèces, rattachées au MTBC, suggère que ce Complexe est probablement plus varié que ce qui était imaginé.

B. LA TUBERCULOSE : UNE MALADIE TRES ANCIENNE MAIS UNE MENACE TOUJOURS ACTUELLE

1. Introduction

La tuberculose est une maladie bactérienne chronique et contagieuse qui affecte l'homme, ainsi que de nombreux animaux domestiques et sauvages. Elle est provoquée par les différentes espèces de mycobactéries du MTBC. L'observation de tubercules, granulomes inflammatoires formés de cellules immunitaires et de caséum (zones nécrotiques), dans les organes ou les nœuds lymphatiques des personnes infectées a donné son nom à la maladie.

2. Histoire de la tuberculose

La tuberculose est une maladie très ancienne puisque l'ancêtre du Complexe *tuberculosis* serait apparu il y a 40 000 ans (Wirth et al. 2008). La présence exclusive de certaines lignées du MTBC sur le continent africain suggère que le Complexe aurait émergé en Afrique de l'Est, puis aurait co-évolué avec l'homme et se serait répandu dans le monde entier par le biais des migrations humaines en Europe, en Asie et en Afrique continentale. Les populations de mycobactéries tuberculeuses étant inféodées à une zone géographique, elles se sont adaptées à la population locale (Gutierrez et al. 2005; Djelouadji et al. 2011; Wirth et al. 2008). Le passage d'un mode de vie nomade à une vie sédentaire dans des fermes agricoles de plus en plus peuplées, ainsi que la domestication des animaux ont probablement contribué à la transmission de la maladie à divers hôtes animaux et à l'adaptation du bacille, permettant l'apparition de *M. bovis*, *M. caprae* et des autres membres du Complexe (Wirth et al. 2008). Les plus anciennes traces d'ADN du Complexe *tuberculosis* ont été découvertes sur des

ossements de bison vieux de 17 000 ans retrouvés dans une grotte d'Amérique du Nord (Rothschild et al. 2001). Des traces d'ADN du Complexe *tuberculosis*, de *M. tuberculosis* ou *M. bovis*, ont été retrouvées sur des ossements humains datant de la Préhistoire ou de l'Antiquité (les plus vieux ont 9000 ans), découverts dans différentes parties du monde (Chili, Royaume Uni, Russie, Israël, Indonésie, etc.) (Djelouadji et al. 2011). Appelée « phtisie » par les Grecs, peste blanche ou consommation (suite au dépérissement des malades), les écrits d'Hippocrate (5^{ème} siècle avant JC) sont les premiers à décrire la symptomatologie et les différentes formes de la tuberculose. Fracastor (15^{ème} siècle) suggère le caractère héréditaire de la maladie, mais place la phtisie dans les maladies contagieuses au même titre que la vérole, hypothèse reprise en 1722 par Marten, puis par Villemin en 1865 qui montre que la maladie est infectieuse, contagieuse et inoculable (Dutau 2005). A la fin du 18^{ème} siècle et au début du 19^{ème}, la tuberculose est la première cause de mortalité en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. La Révolution industrielle et le développement des villes favorisent l'expansion de la maladie, les conditions de vie insalubres des taudis de banlieues, la promiscuité et la pauvreté accélèrent l'endémie et à cette époque environ une personne sur 4 est atteinte de tuberculose. La fin du 19^{ème} siècle voit se succéder les découvertes à un rythme effréné dont les principales sont la découverte du bacille en 1882 par Koch, la découverte du bacille bovin en 1896, l'utilisation de la tuberculine dans le diagnostic humain en 1907, la création d'une souche atténuée *M. bovis* BCG en 1921 et le début de la vaccination en 1924. La découverte de la streptomycine en 1944, le premier antibiotique contre la tuberculose, puis de l'isoniazide en 1952 et la rifamycine en 1957 a marqué une étape importante dans le traitement contre la tuberculose (Daniel 2006).

3. La tuberculose bovine

a. Introduction

La tuberculose bovine est une maladie bactérienne, contagieuse, d'évolution chronique causée par *Mycobacterium bovis*. Cette bactérie a pour hôte originel les bovins, mais peut infecter un grand nombre d'espèces de mammifères, dont l'homme (Gavier-Widén et al. 2009; Broughan, Crawshaw, et al. 2013; Grange & Yates 1994), ce qui en fait une maladie zoonotique. Elle a un tropisme respiratoire prédominant, mais peut infecter un grand nombre d'autres organes. La tuberculose bovine fait partie des maladies animales à déclaration obligatoire auprès de l'Office International des Epizooties (OIE).

Le passage de l'infection dans la faune sauvage a compliqué le schéma d'éradication de la maladie chez les bovins, puisque certaines espèces sauvages peuvent entretenir la maladie et contaminer les bovins en retour. A l'heure actuelle, *M. bovis* fait partie des six organismes pathogènes prioritaires ciblés par les programmes de surveillance européens (Ciliberti et al. 2015).

b. Les hôtes et les communautés d'hôtes de *Mycobacterium bovis* dans le monde et leurs statuts épidémiologiques

Mycobacterium bovis est la mycobactérie du MTBC qui possède le plus large spectre d'hôtes, incluant l'homme (Grange 2001; O'Reilly & Daborn 1995). L'infection a été retrouvée chez de nombreuses espèces de mammifères appartenant aux Ordres des marsupiaux, des carnivores, des primates, des rongeurs, des lagomorphes et des artiodactyles (Broughan, Downs, et al. 2013; O'Reilly & Daborn 1995; Palmer 2013).

La circulation de l'infection chez des hôtes appartenant à des espèces domestiques et sauvages différentes est à l'origine de systèmes épidémiologiques complexes, appelés système multi-hôtes (Haydon et al. 2002) qui complexifient fortement les schémas d'éradication de la maladie. Dans ces systèmes, les différents hôtes peuvent avoir un statut épidémiologique différent (Haydon et al. 2002; Palmer 2013) ou former une communauté d'hôtes réservoir (Palmer 2013). Les hôtes de maintenance ou réservoirs définissent une population d'animaux dans laquelle l'infection est entretenue de façon autonome. Ils sont à l'origine de l'infection des espèces cibles. Les hôtes de liaison sont incapables de maintenir l'infection indéfiniment au sein de leur population, à moins qu'ils soient réinfectés par une autre espèce. Ils sont toutefois capables de transmettre l'infection à d'autres populations (Corner 2006; Nugent 2011). Et enfin, les hôtes « cul-de-sac » définissent les espèces qui ne peuvent pas maintenir ni transmettre la maladie (Nugent 2011). Différentes espèces ont ainsi été identifiées comme des réservoirs de l'infection, notamment le blaireau (*Meles meles*) en Angleterre et en Irlande (Delahay et al. 2001), le sanglier (*Sus scrofa*) dans le centre et le sud de l'Espagne (Naranjo et al. 2008), le cerf élaphe en France (Zanella et al. 2008), le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) dans le Michigan (USA) (Palmer 2013; O'Brien et al. 2006), le bison des bois (*Bison bison athabasca*) et le wapiti (*Cervus elaphus manitobensis*) au Canada (Nishi et al. 2006; Wobeser 2009), le phalanger renard (*Trichosurus vulpecula*) en Nouvelle-Zélande (Morris et al. 1994; Nugent 2011) et le buffle (*Syncerus caffer*) en Afrique du Sud (Renwick et al. 2007). D'autres espèces animales ont été identifiées comme hôtes de liaison comme le furet, le cerf et le sanglier en Nouvelle-Zélande.

La transmission retour de l'infection par les espèces sauvages réservoir est une menace pour les bovins et les espèces sauvages sensibles vivant à proximité. La connaissance du statut épidémiologique de chaque espèce est important pour comprendre le rôle de la faune sauvage dans la maintenance et la transmission de l'infection et adapter les programmes de lutte et d'éradication de la maladie chez les bovins, les animaux sauvages et l'homme (Delahay et al. 2001; Corner 2006).

c. Aspect zoonotique de *Mycobacterium bovis*

Plusieurs mycobactéries du MTBC peuvent engendrer une tuberculose zoonotique chez l'homme. Le principal agent infectieux impliqué est *M. bovis* (Thoen et al. 2006), dans une moindre mesure *M. caprae* (EFSA 2014) et *M. microti* (Panteix et al. 2010). Cette dernière a un pouvoir zoonotique plus faible, mais n'est pas négligeable. La tuberculose zoonotique à *M. bovis* est majoritairement liée à la consommation de produits issus d'animaux infectés, principalement le lait cru et ses dérivés (transmission indirecte) (Evans et al. 2007). La transmission par aérosols respiratoires est également décrite lors de contacts rapprochés avec des animaux domestiques ou sauvages infectés (transmission directe) (Cosivi et al. 1999; Ayele et al. 2004; Kleeberg 1984). L'infection est sporadiquement rapportée chez des éleveurs de bovins et de cerfs (Smith et al. 2004; Fanning & Edwards 1991), du personnel vétérinaire (Shrikrishna et al. 2009) et du personnel d'abattoir (Liss et al. 1994). La transmission interhumaine de *M. bovis* par voie respiratoire existe chez les patients immunodéprimés ou immunocompétents, mais reste rare (Evans et al. 2007; Grange & Yates 1994; de la Rua-Domenech 2006; Sunder et al. 2009; Shrikrishna et al. 2009; Rivero et al. 2001).

Les signes cliniques chez l'homme sont identiques à ceux retrouvés lors de tuberculose à *M. tuberculosis* et se traduisent par une tuberculose pulmonaire et/ou des atteintes extra-pulmonaires, plus fréquentes qu'avec *M. tuberculosis* en raison des différences dans le mode de transmission (atteintes ostéo-articulaires, ganglionnaires, uro-génitales, disséminées...)(Antoine & Jarlier 2010; Delaune et al. 2012; Mignard et al. 2006). Le traitement repose sur l'administration d'antituberculeux classiques, à l'exception du pyrazinamide pour lequel *M. bovis* est naturellement résistant. Des souches MDR (Multi Drug Resistant) sont régulièrement signalées chez l'homme (McLaughlin et al. 2012; Cambau et al. 2003). De rares souches XDR (Extensively Drug Resistant) sont également décrites, majoritairement chez des patients séropositifs (Rivero et al. 2001). Dans les pays industrialisés, l'infection est principalement diagnostiquée chez des personnes âgées et/ou immunodéprimées (diabète, VIH, traitement immunosuppresseur, alcoolisme...) dont les formes extra-pulmonaires majoritaires évoquent une contamination ancienne par voie digestive (avant la mise en place de la pasteurisation du lait) et la réactivation ultérieure de la maladie, ainsi que chez des personnes nées ou ayant séjourné dans des pays où la maladie est endémique (Delaune et al. 2012).

Les pays ayant mis en place la pasteurisation du lait et des programmes de lutte efficaces contre la maladie chez les bovins (dépistage et abattage) ont fortement réduit l'incidence de la maladie chez l'homme et les bovins. Malgré quelques cas régulièrement décrits chez l'homme, la tuberculose zoonotique est une zoonose mineure dans les pays développés, notamment en Europe (Torgerson & Torgerson 2010; Michel et al. 2010). En France, l'obligation de pasteurisation du lait en 1955 associée à l'abattage systématique des bovins réagissant à la tuberculination à partir de 1963 ont permis de faire

baisser l'incidence de l'infection à *M. bovis* chez l'homme de 1,5% dans les années 60 à 0,5% en 1995 (Boulaïbal et al. 1998). Des études locales mettent parfois en évidence des prévalences plus élevées, de l'ordre de 2% à Lyon entre 2000 et 2005 (Mignard et al. 2006) et de 2,9% en Aquitaine entre 2004 et 2008 (Aimé et al. 2012). Au Royaume-Uni, par exemple, malgré l'incidence élevée chez les bovins (1806 nouveaux foyers entre janvier et avril 2015)(site DEFRA), la prévalence de la maladie n'augmente pas chez l'homme grâce aux programmes de lutte mis en place chez l'animal (Torgerson & Torgerson 2010; Jalava et al. 2007).

La situation est très différente dans les pays en voie de développement (PVD). L'absence de programme de lutte contre la tuberculose bovine et la consommation de lait cru dans des pays où la maladie est endémique chez les bovins, notamment dans certains pays d'Afrique, d'Amérique du sud et d'Asie, représentent un risque de santé publique important (Cosivi et al. 1999; Ayele et al. 2004). La tuberculose zoonotique est souvent fortement reliée à la prévalence de l'infection bovine dans le pays ou la région (Fetene et al. 2011) et touche majoritairement les professions en contact avec les bovins (éleveurs de bovins, personnel d'abattoir et d'usines agro-alimentaire...) et les consommateurs de lait cru et de fromage frais, dont les enfants, d'autant plus s'ils sont immunodéprimés. Une étude récente rapporte 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) . L'infection par le HIV, 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). Dans les PVD, le diagnostic chez l'homme s'arrête parfois à l'observation microscopique de BAAR, associés à *M. tuberculosis*, sous-estimant probablement l'occurrence de *M. bovis* (Cosivi et al. 1999; Michel et al. 2010). La transmission retour de l'infection de l'homme aux bovins pourrait avoir un impact non négligeable dans les PVD, mais aucune donnée n'est disponible (de la Rua-Domenech 2006).

d. Pathogénie de la tuberculose bovine

La pathogénie de la maladie est multifactorielle et dépend de facteurs liés au pouvoir pathogène de *M. bovis*, à la réceptivité et la sensibilité de l'hôte exposé, ainsi qu'à la voie d'infection.

- (1) Facteurs influençant le pouvoir pathogène de *M. bovis* : voies d'infection et dose infectante

La voie respiratoire est la voie de contamination majeure chez les bovins (Pritchard 1988; Morris et al. 1994; Phillips et al. 2003). Des infections expérimentales de *M. bovis* par voie nasale, intra

trachéale ou intra-tonsillaire, ainsi que par la mise en contact d'animaux sains avec des animaux infectés ont confirmé l'efficacité de la transmission de *M. bovis* par cette voie (Palmer et al. 1999; Dean et al. 2005; Johnson et al. 2007; Collins & Grange 1983; Cassidy et al. 1999). La dose infectante par voie respiratoire est très faible, puisque l'inoculation intra-trachéale de 6 à 10 bacilles viables à des veaux suffit à provoquer des lésions pulmonaires et/ou ganglionnaires (Dean et al. 2005; Johnson et al. 2007). Des résultats identiques ont été obtenus chez le blaireau (Corner et al. 2007; Corner et al. 2011). Chez le cerf de Virginie, l'inoculation intra-tonsillaire de 300 à 500 UFC (Unité Formant Colonie) infecte 100% des animaux (Palmer et al. 2002; Griffin et al. 2006). L'inoculation oro-pharyngée de 100 UFC à des sangliers déclenche uniquement des lésions amygdaliennes, alors que 10 000 UFC entraînent des lésions pulmonaires et ganglionnaires sévères (Ballesteros et al. 2009). Chez toutes ces espèces, la dose infectante affecte la sévérité et la progression de la maladie (Neill et al. 1994; Palmer et al. 2002; Corner et al. 2007).

La transmission de la tuberculose bovine peut également se faire par voie digestive, suite à l'ingestion de matrices contaminées. La dose infectante nécessaire serait bien supérieure à celle par voie respiratoire et selon certains auteurs nécessiterait plusieurs millions de bacilles (Phillips et al. 2003; O'Reilly & Daborn 1995). Pour les veaux, Palmer et al (2004) ont estimé à 5 000 UFC la dose infectante par cette voie. L'ingestion répétitive de faibles doses de *M. bovis* semble également représenter un facteur de risque, comme cela a été démontré chez le cochon d'Inde (Maddock 1934). La transmission par voie cutanée ou transcutanée, ainsi que la transmission de la mère au veau par consommation de lait contaminé ou par léchage sont également décrites mais restent rares (Phillips et al. 2003; Morris et al. 1994). La transmission du bacille par voie transcutanée (morsure) par le biais de salive infectée est régulièrement décrite chez le blaireau en Angleterre (Corner et al. 2011).

(2) Facteurs influençant la réceptivité et la sensibilité de l'hôte

De nombreux facteurs intrinsèques à l'animal entrent en jeu dans la réceptivité et la sensibilité de l'hôte à la maladie, notamment l'espèce, la race, l'âge, le sexe et l'état général (Griffin et al. 1996; Menzies & Neill 2000; Humblet et al. 2009; Goodchild & Clifton-Hadley 2001). Certains animaux présentent une résistance naturelle ou au contraire une sensibilité exacerbée à l'infection ou à la progression de la maladie (Gavier-Widén et al. 2009). Des mécanismes modulant la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte ont pu être mis en évidence chez le cerf (Mackintosh et al. 2000). Les caractéristiques génétiques de l'hôte pourraient également jouer un rôle important dans la résistance ou la sensibilité à l'infection (Mackintosh et al. 2000; Acevedo-Whitehouse et al. 2005; Brotherstone et al. 2010). Des études récentes sur des génomes complets de bovins ont identifié des

loci particuliers impliqués dans la résistance à la maladie (Bermingham et al. 2014), ouvrant des perspectives de sélection génomique de populations résistantes à la tuberculose bovine (Tsairidou et al. 2014).

Le statut immunitaire de l'animal est un facteur important puisque certains animaux sont capables d'éliminer le bacille grâce à leur immunité innée et/ou acquise, certains sont capables de contrôler l'infection plusieurs années dans les granulomes et d'autres développent une tuberculose évolutive (Pollock & Neill 2002). La modulation immunitaire expliquerait pourquoi dans un cheptel bovin, malgré la contagiosité importante de *M. bovis*, seuls quelques animaux sont infectés (Cassidy 2006). Les notions de latence et de réactivation de la maladie, décrites chez *M. tuberculosis*, sont discutées dans la tuberculose bovine (Cassidy 2006) et commencent à être appréhendées (Álvarez et al. 2009).

(3) Les étapes de l'infection et la réponse immunitaire associée

Lorsque les bactéries pénètrent dans l'organisme, le plus souvent au niveau des alvéoles pulmonaires, elles sont phagocytées par les macrophages. Si la dose infectante est importante ou l'immunité insuffisante, les mycobactéries échappent à la digestion et se multiplient, permettant la formation dans le tissu pulmonaire de la lésion primaire appelée chancre d'inoculation. La primo-infection est caractérisée par le « complexe primaire » qui associe le chancre d'inoculation et les nœuds lymphatiques infectés par le drainage de la lésion primaire (Neill et al. 1994). L'infection peut ensuite évoluer selon 3 modes différents : la guérison avec une élimination des bacilles, la stabilisation caractérisée par une réactivation possible de l'infection quelques mois ou années plus tard ou la généralisation précoce de l'infection liée à une multiplication active des bactéries et à leur dissémination dans l'organisme. L'infection et son évolution sont toutefois fortement dépendantes de la dose infectante, de la voie d'entrée de la bactérie, de la réceptivité et de la sensibilité de l'hôte évoquées précédemment.

Chez l'animal infecté par *M. bovis*, la réponse immunitaire à médiation cellulaire est la première à se mettre en place dans les stades précoces de l'infection par la mobilisation de macrophages et de lymphocytes T (Figure 5). Ces derniers libèrent différentes cytokines, dont l'interféron- γ (IFN- γ), qui active les macrophages et la formation de granulomes pour isoler et détruire l'agent infectieux. L'immunité à médiation humorale se met en place tardivement et remplace peu à peu l'immunité à médiation cellulaire dans les stades plus avancés de la maladie par la production d'anticorps par les lymphocytes B (Pritchard 1988; Ritacco et al. 1991; Fifis et al. 1994). Les différents tests utilisés pour le dépistage de l'infection chez les bovins reposent principalement sur l'immunité à médiation cellulaire (Figure 5).

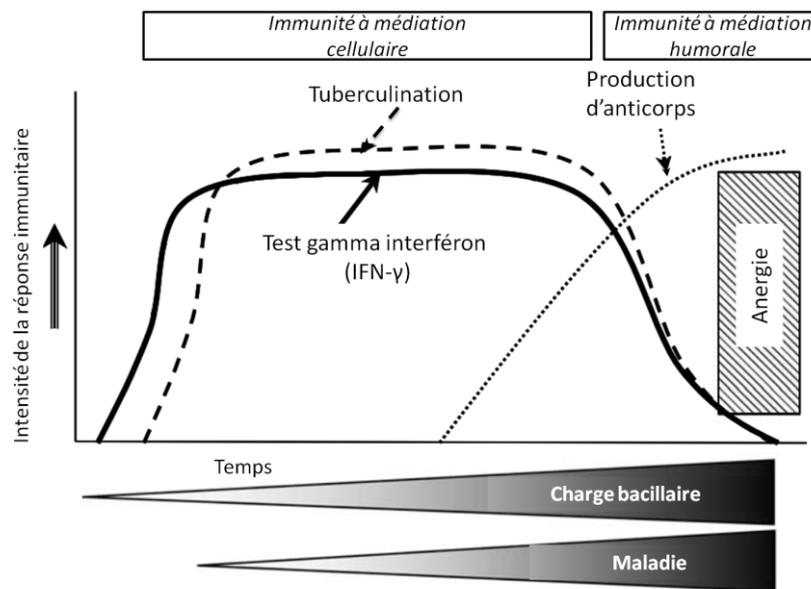


Figure 5: Evolution de la réponse immunitaire chez le bovin infecté par *M. bovis* au cours du temps et aux différents tests de dépistage de la tuberculose bovine (de la Rua-Domenech et al. 2006, adapté de Vordermeier et al. 2004)

(4) Expression clinique de la maladie et lésions observées

La tuberculose bovine est une maladie chronique d'évolution lente, généralement asymptomatique dans ses débuts. Lorsque la maladie évolue, hormis l'amaigrissement possible, les signes cliniques sont très variables et dépendent des organes ou tissus atteints, mais ne sont pas pathognomoniques (de la Rua-Domenech et al. 2006). La localisation des lésions observées chez les animaux dépend généralement de la voie d'entrée de la bactérie et de l'évolution de la maladie. Chez les bovins, la majorité des lésions sont retrouvées dans la cavité thoracique avec une atteinte des lobes pulmonaires et des nœuds lymphatiques associés (bronchiques et médiastinaux) et/ou des nœuds lymphatiques céphaliques (rétro-pharyngiens principalement). Les lésions sur les nœuds lymphatiques mésentériques, la rate et le foie sont plus rares (Neill et al. 1994).

Chez le blaireau infecté naturellement, la sévérité de la maladie est très variable, d'une infection latente asymptomatique sans lésion macroscopique visible à une maladie modérée avec des lésions pulmonaires ou extra-pulmonaires de petite taille, jusqu'à une maladie généralisée entraînant la cachexie puis la mort de l'animal (Murphy et al. 2010). Les lésions retrouvées sont essentiellement respiratoires, probablement liées à l'inhalation d'aérosols contaminés, plus rarement digestives, et cutanées suite à des morsures de congénères infectés (Corner et al. 2011; Payne et al. 2012; Gavier-Widen et al. 2001). Toutefois, différentes études ont montré que la majorité des blaireaux infectés ne

présente pas de lésion visible (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Jenkins et al. 2008; Payne et al. 2012). Les blaireaux constituent des hôtes de persistance efficaces, puisqu'ils peuvent supporter l'infection plusieurs années et se reproduire, tout en excréant la bactérie (Delahay et al. 2001).

Chez le sanglier, les lésions sont majoritairement observées dans les nœuds lymphatiques céphaliques, notamment les mandibulaires, dans les poumons et moins fréquemment au niveau mésentérique (Zanella et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2007; Naranjo et al. 2008). Des formes généralisées sont également décrites (Naranjo et al. 2008).

Le cerf est une espèce décrite comme très sensible à l'infection par *M. bovis* et développe des lésions ouvertes et disséminées, pouvant être à l'origine d'une excrétion bacillaire importante (Lugton et al. 1998; Palmer et al. 2004). Les lésions sont généralement localisées au niveau des nœuds lymphatiques céphaliques et des poumons (Palmer et al. 2004; Delahay et al. 2002), des nœuds lymphatiques mésentériques, voire généralisées (Zanella et al. 2008).

e. Le dépistage et le diagnostic de l'infection chez les animaux

Le dépistage de l'infection chez les bovins vivants repose sur plusieurs modes de surveillance (Cavalerie et al. 2014).

La surveillance systématique à l'abattoir concerne tous les bovins abattus pour la consommation humaine. Il repose sur un examen *post mortem* de l'animal avec l'inspection d'un certain nombre d'organes cibles de l'infection (poumons, nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens, trachéo-bronchiques et médiastinaux). Dans le cas de lésions suspectes visibles, celles-ci sont prélevées et transmises à un laboratoire agréé pour recherche de mycobactéries par PCR et culture.

La surveillance programmée en élevage repose sur le dépistage de la maladie par prophylaxie. Le rythme des prophylaxies est fixé par le préfet en fonction de la situation sanitaire du département. Dans les départements où cette surveillance est absente, le dépistage dépend alors uniquement de la surveillance à l'abattoir. Pour quelques départements à fort risque, elle est annuelle et peut être complétée par un dépistage lors de mouvements d'animaux. Le test de dépistage de référence est l'intradermotuberculation (IDR). Ce test vise à mettre en évidence *in vivo* la réaction d'hypersensibilité retardée consécutive à l'injection intradermique de tuberculine (protéines purifiées de surnageant de culture de mycobactéries) chez un bovin infecté (Buddle et al. 2011; De la Rua-Domenech et al. 2006). Cette réaction se traduit par une tuméfaction cutanée douloureuse et chaude. Deux types d'IDR sont utilisés : l'Intradermotuberculation simple ou IDS qui consiste en l'injection intradermique de tuberculine bovine sur le plat de l'encolure et l'Intradermotuberculation comparative ou IDC qui associe l'injection intradermique de tuberculine bovine et de tuberculine aviaire. L'IDC est utilisée dans certains départements, dont la Côte d'Or où de nombreuses

mycobactéries environnementales sont retrouvées, pour augmenter la spécificité du test et écarter les réactions croisées chez les bovins sensibilisés à une autre mycobactérie (des antigènes sont communs entre les mycobactéries) (De la Rúa-Domenech et al. 2006; OIE 2009).

L'IDR peut être complétée par le dosage de l'Interféron γ (IFN γ). Cette cytokine, qui est libérée par les lymphocytes T activés lors d'une stimulation antigénique *in vivo* mais également *in vitro*, permet entre autre l'activation de la fonction phagocytaire des macrophages. La quantité d'IFN γ libérée lors de la culture de sang total avec de la tuberculine bovine ou aviaire est suffisante pour être mesurée par un test ELISA (Gormley et al. 2006; de la Rúa-Domenech et al. 2006). Le dosage de l'IFN γ est pratiqué pour renforcer l'IDR lorsque la contention des animaux est difficile, essentiellement en Camargue et dans les Landes pour les taureaux de combat. Il est également utilisé à titre expérimental dans quelques départements, comme la Dordogne et la Côte d'Or (Fediaevsky et al. 2014) pour renforcer les résultats d'IDR.

D'autres tests, notamment sérologiques, sont en cours d'évaluation chez les bovins. Les essais réalisés jusqu'à maintenant montrent une sensibilité et une spécificité inférieures à l'IDR ou l'IFN γ , notamment chez les animaux en début d'infection, mais ils représentent un axe de recherche important au vu du faible coût et de la simplicité de la technique (Waters et al. 2011; de la Rúa-Domenech et al. 2006).

La sérologie et l'IFN γ font l'objet de nombreux développements pour l'amélioration de la surveillance de la maladie chez les animaux sauvages. Récemment des techniques ELISA ont été développées pour de nombreuses espèces, dont les sangliers, les cerfs, les bisons (Boadella et al. 2011; Shuralev et al. 2012; Boadella et al. 2012; Lyashchenko et al. 2013; Chapinal et al. 2012). L'IFN γ est également testé pour le dépistage chez les espèces sauvages, notamment chez les cervidés d'élevage et les blaireaux (Palmer et al. 2010; Dalley et al. 2008). La sérologie (kit commercial Brock Stat-Pack, Chembio Diagnostic Systems) et le dosage de l'IFN γ (méthode ELISA) sont utilisés en routine après capture et prélèvement sanguin pour le suivi épidémiologique de groupes sociaux de blaireaux à Woodchester Park en Angleterre (Drewe et al. 2010; King, Murphy, James, Travis, Porter, Sawyer, et al. 2015; King, Murphy, James, Travis, Porter, Hung, et al. 2015). La combinaison des deux tests est conseillée pour améliorer la sensibilité et la spécificité du dépistage (Drewe et al. 2010). Une méthode de dépistage non invasive basée sur la collecte puis l'analyse par qPCR des latrines a été évaluée sur douze groupes sociaux en parallèle avec la sérologie et le dosage de l'IFN γ (King, Murphy, James, Travis, Porter, Sawyer, et al. 2015; King, Murphy, James, Travis, Porter, Hung, et al. 2015). Bien que moins contraignante et moins coûteuse que le suivi par capture, l'analyse des latrines pour l'identification des groupes sociaux de blaireaux positifs nécessite au moins deux campagnes annuelles de prélèvements (début et fin d'été) avec un nombre d'échantillons minimum variable selon les groupes sociaux (de 10 à plus de 20) à cause de l'excrétion intermittente du bacille par les blaireaux infectés. De plus, elle ne

permet pas un dépistage individuel.

Concernant le diagnostic de la tuberculose bovine, l'infection chez les bovins par *M. bovis* doit être établie par histologie en cas de lésion et confirmée par culture selon la réglementation européenne. L'histologie est réalisée sur des coupes de nœuds lymphatiques et de lésions fixées à la formaline. La culture repose sur le protocole développé et amélioré par le Laboratoire National de Référence (LNR), devenu la norme NF U47-104, qui associe une phase de broyage-décontamination des échantillons puis un ensemencement sur deux milieux à l'œuf (Löwenstein-Jensen et Coletsos) (OIE 2009). Toutefois ces deux techniques présentent des inconvénients car l'histologie manque de spécificité (environ 92 %) par rapport à la culture (Varello et al. 2008) et le résultat de culture est peu sensible, long (entre trois semaines et trois mois), ce qui pose des problèmes pratiques en cas de suspicion (restriction des mouvements du cheptel). Bien que pratiquée depuis quelques années sans base réglementaire, il a été démontré que la PCR basée sur la détection de l'*IS6110* (kit commercial LSI VetMAX™ *Mycobacterium tuberculosis* Complex PCR kit) serait un outil performant de diagnostic de la tuberculose chez les bovins avec une bonne spécificité (97 %) et une sensibilité supérieure à la culture (87,7 % vs 78,1 %) (Courcoul et al. 2014). En apportant un diagnostic en 48 heures, la PCR permettrait une gestion plus rapide des foyers.

Le diagnostic dans la faune sauvage repose sur une PCR systématique sur les lésions évocatrices de tuberculose ou un pool de nœuds lymphatiques en l'absence de lésions. En cas de résultat non négatif, l'échantillon est mis en culture pour identification de l'agent infectieux (Source Note de service DGAL/SDSPA/2015-556 du 26/06/2015). Quelle que soit l'espèce concernée, la culture et la PCR sont réalisées par des laboratoires agréés. En cas de PCR et/ou de culture positive, les échantillons sont systématiquement envoyés au Laboratoire National de Référence pour la tuberculose bovine pour confirmation et génotypage des souches.

f. Epidémiologie de la tuberculose bovine

(1) Evolution de la tuberculose bovine dans le monde et en Europe et mesures de lutte

Avant 1920, la tuberculose bovine était l'une des maladies majeures des animaux domestiques à l'échelle mondiale. A l'heure actuelle, elle est toujours largement répandue dans le monde (Cosivi et al. 1999). La maladie est plutôt sporadique et limitée à quelques régions dans les pays industrialisés touchés (sauf en Irlande, au Royaume-Uni, en Espagne et au Portugal) et endémique dans les pays à faibles revenus d'Afrique, d'Amérique du sud et d'Asie (Figure 6).

Dans les pays industrialisés, la mise en place de la pasteurisation du lait dans les années 1950-60 et des programmes d'éradication de la maladie basés sur le dépistage et l'abattage des bovins infectés ont permis de réduire fortement l'incidence de l'infection chez les bovins et l'homme. Aujourd'hui, dans ces pays, la tuberculose bovine représente principalement un enjeu socio-économique lié aux restrictions des échanges internationaux d'animaux et aux coûts des programmes de lutte contre la maladie chez les animaux, le problème sanitaire est devenu mineur. Dans les pays à faibles revenus où l'absence ou quasi-absence de contrôle de la maladie chez les bovins et la consommation de lait et produits dérivés crus, les enjeux de la tuberculose bovine sont à la fois sanitaires et socio-économiques.

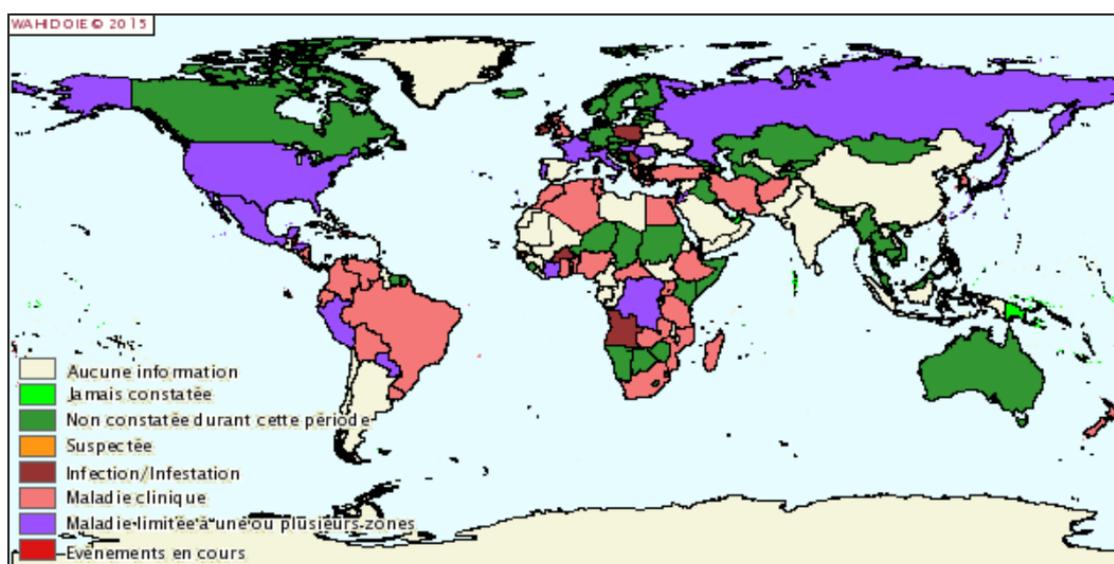


Figure 6: Carte de distribution de la tuberculose bovine chez les bovins entre juillet et décembre 2014 (Source : WAHID Interface)

En Europe, depuis plus d'un siècle, l'éradication de la maladie a été un objectif majeur pour les organisations agricoles et les autorités publiques (Reviriego-Gordejo & Vermeersch 2006). Les mesures réglementaires élaborées notamment par l'OIE (Office International des Epizooties, aujourd'hui appelé Organisation Mondiale pour la Santé Animale) visent à sécuriser les échanges commerciaux d'animaux, l'amélioration des techniques de dépistage de la maladie, les programmes d'éradication et leurs aides financières. Les programmes mis en place chez les bovins ont permis de faire fortement diminuer l'incidence de la maladie dans la plupart des pays de l'Union Européenne (de la Rua-Domenech et al. 2006), voire de l'éradiquer leur conférant le statut de pays « officiellement indemne de tuberculose bovine » (OTF : Officially Tuberculosis Free). Le statut OTF est attribué à un pays lorsque :

- le pourcentage de cheptels bovins confirmés comme infectés n'excède pas 0,1% par an pour tous les cheptels pendant 6 ans,

- chaque bovin est identifié en accord avec la réglementation européenne,
- tous les bovins abattus subissent un examen *post-mortem* officiel (Reviriego-Gordejo & Vermeersch 2006).

Ce statut est très important pour l'économie d'un pays, puisqu'il facilite le commerce national et international des animaux par un allègement des contrôles sanitaires avant l'exportation de leurs bovins dans un autre pays membre ou avant leur abattage, en les exemptant notamment d'une tuberculination (Reviriego-Gordejo & Vermeersch 2006). Les pays européens officiellement indemnes de tuberculose sont l'Allemagne, l'Autriche, la Belgique, le Danemark, l'Estonie, la Finlande, la France, l'Ecosse, la Lettonie, le Liechtenstein, le Luxembourg, la Norvège, les Pays-Bas, la Pologne, la République Tchèque, la Slovaquie, la Slovénie, la Suède, la Suisse et une partie de l'Italie (Figure 7). Les pays d'Europe les plus touchés sont la Grande-Bretagne, l'Irlande et l'Espagne avec des prévalences respectives de 10,4%, 4,4% et 1,2% en 2012 (EFSA 2014). Toutefois, dans certains pays OTF comme la France, la Belgique, l'Allemagne, l'Autriche et la Pologne l'éradication de la maladie n'est pas complète malgré la prévention, les contrôles et la surveillance engagés. Dans ces pays, l'éradication de la maladie est fortement compliquée par la circulation de l'infection dans des réservoirs sauvages, source potentielle de contamination pour les bovins (Corner 2006; Nugent 2011; Gortázar et al. 2012).

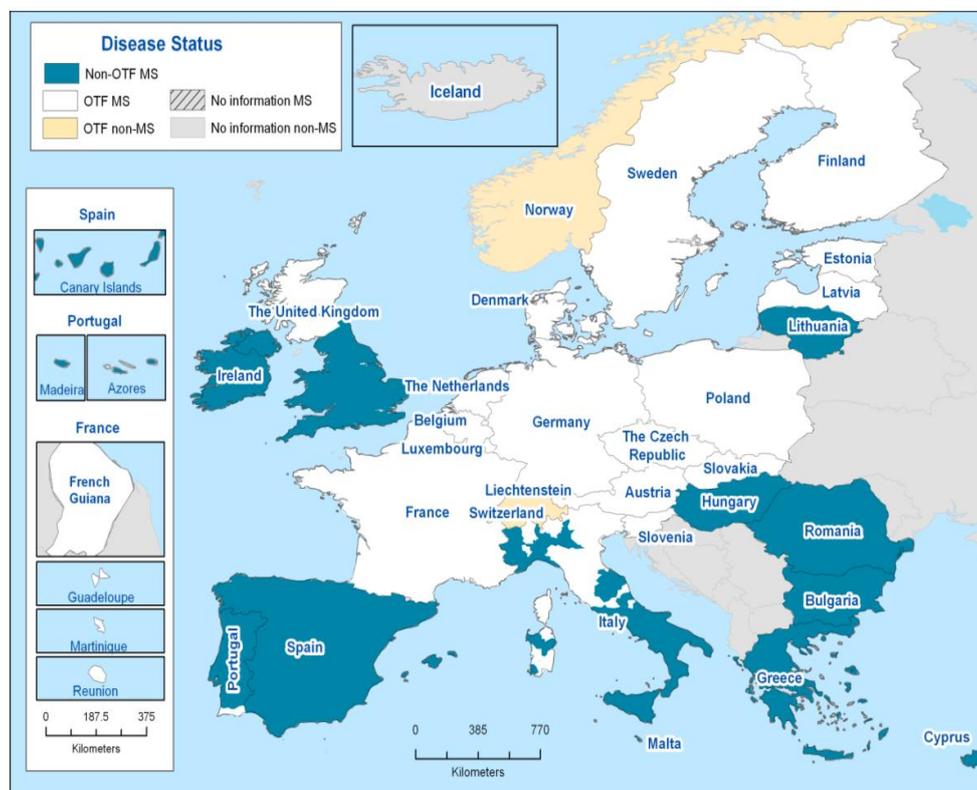


Figure 7: Statuts des pays européens vis-à-vis de la tuberculose bovine en 2012 et proportion de bovins infectés. OTF : Officially Tuberculosis Free (officiellement indemne de tuberculose bovine), MS : Member State (Etat membre). (Source : EFSA 2014)

(2) Evolution de la situation sanitaire en France

- Chez les bovins

Dans les années 50, environ 25 % des cheptels bovins français étaient infectés par la tuberculose bovine (Bénet et al. 2006). Cette prévalence importante avait un fort impact économique (saisies de viande à l'abattoir, diminution de la productivité en viande et en lait), mais aussi sanitaire, puisque 2 à 11% des cas de tuberculose chez l'homme étaient imputés à *M. bovis*. Les programmes de lutte mis en place ont permis de faire diminuer de façon spectaculaire la prévalence cheptel de la maladie de 25% en 1955 à moins de 0,1% dès 1998, permettant à la France d'accéder au statut OTF en 2000 (Figure 8). Ce statut a permis d'alléger voire de stopper la prophylaxie sur le territoire, d'alléger les contrôles mis en place pour les mouvements de bovins dans l'UE et de fournir une garantie sanitaire aux pays importateurs de bovins français dans l'UE et en dehors.

Les programmes de lutte contre la tuberculose bovine reposent sur une base réglementaire en évolution constante élaborée par les services vétérinaires (maintenant DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations) en collaboration technique avec les vétérinaires sanitaires, les groupements de défense sanitaire (GDS) et les laboratoires d'analyse agréés. Ces programmes sont basés sur la surveillance systématique et généralisée en abattoir (inspection post-mortem, recherche et identification de mycobactéries par culture et PCR sur les lésions suspectes) et sur la surveillance programmée en élevage (dépistage par intradermo-tuberculation et abattage total ou partiel des troupeaux infectés). Ils assurent également la protection des cheptels indemnes par la maîtrise des facteurs de diffusion de la tuberculose bovine, tels que l'introduction d'un animal, le voisinage avec des cheptels infectés et la résurgence (Fediaevsky et al. 2014). Depuis 2013, deux Cellules Inter Régionales d'Epidémiologie Vétérinaire (CIREV) ont été créées, en Bourgogne et en Aquitaine, afin de renforcer les investigations épidémiologiques pour adapter de façon optimale les mesures de lutte contre la maladie (Fediaevsky et al. 2013)

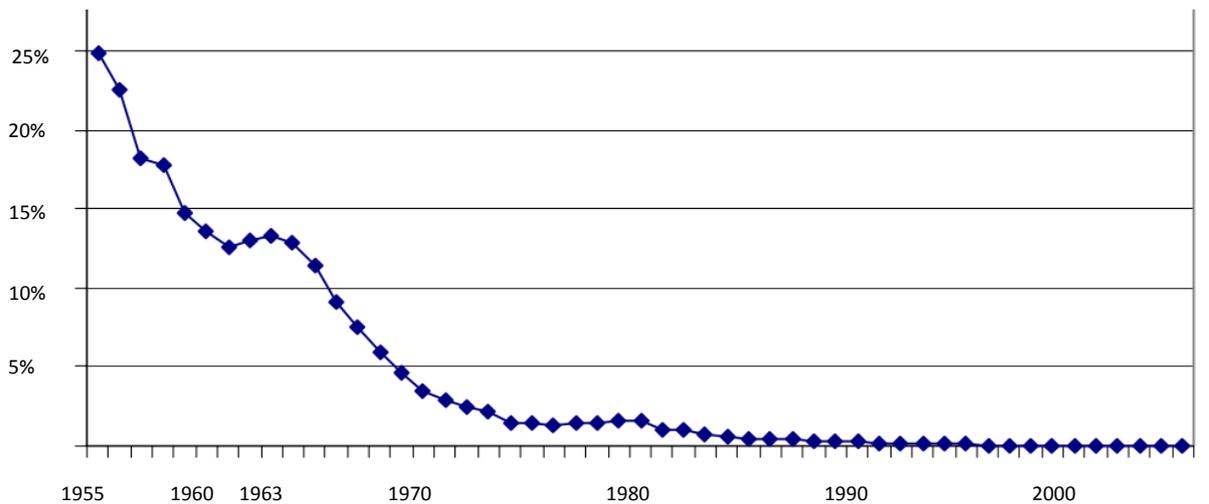


Figure 8: Evolution du taux de prévalence annuelle nationale de la tuberculose bovine chez les bovins (Bénet et al. 2006)

Depuis 2004, la France connaît une situation préoccupante vis-à-vis de la tuberculose bovine car l'augmentation du taux de prévalence met en danger le statut OTF du pays (Figure 9). Cette augmentation est liée à l'apparition de nouveaux foyers de tuberculose concentrés dans des zones géographiques bien localisées : la Côte d'Or, la Dordogne et les Pyrénées Atlantiques cumulent 75% des foyers, et dans une moindre mesure la Charente, la Camargue, les Hautes Pyrénées, l'Ariège, les Landes et la Corse (Figure 10). Dans ces départements, caractérisés par de l'élevage allaitant prédominant, la contamination des troupeaux par le voisinage (par contacts directs avec des bovins voisins ou des animaux sauvages infectés ou par contacts indirects avec du matériel ou des matrices contaminants) et l'introduction d'un animal infecté dans le cheptel (notamment par l'achat d'animaux, le prêt et la pension) représentaient la moitié des cas en 2011. La résurgence d'une ancienne infection (qui persiste à bas bruit chez les animaux ou dans des matrices environnementales souillées) et la faune sauvage étaient à l'origine présumée d'environ 10 % des cas respectivement, toutefois sans démonstration scientifique. Pour 35 % des foyers bovins, l'origine de l'infection était inconnue (Fediaevsky et al. 2012). La contamination des bovins *via* le voisinage, la résurgence et les foyers d'origine inconnue soulèvent la question du rôle de la transmission indirecte de *M. bovis* entre la faune sauvage et les bovins et donc le rôle potentiel de l'environnement comme réservoir du bacille.

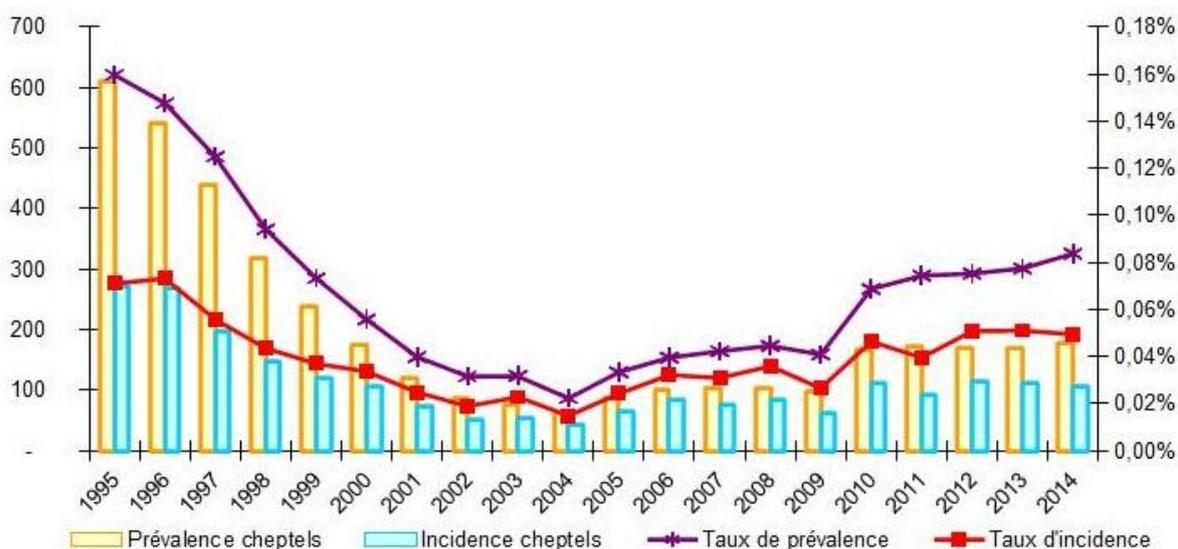


Figure 9: Evolution de la prévalence et de l'incidence de la tuberculose bovine en France entre 1995 et 2014 (Cavalerie et al. 2014)

La menace de la perte du statut OTF inquiète les pouvoirs publics et les instances agricoles, car la France est le plus gros exportateur de bovins vivants de l'UE : elle exporte principalement des bovins maigres en Italie et en Espagne pour l'engraissement (environ 1,2 million de têtes), mais aussi des gros bovins destinés à la boucherie (220 000 têtes) et des veaux (128 000 têtes) (Source : France AgriMer, les filières de l'élevage français, édition 2013). Les conséquences économiques sur la filière-agroalimentaire liées au blocage des animaux seraient considérables. De plus, la gestion sanitaire de la tuberculose bovine est très coûteuse, puisque environ 20 millions d'euros sont dépensés chaque année à l'échelle nationale pour l'indemnisation des éleveurs et la réalisation des analyses vétérinaires (Fediaevsky et al. 2014).

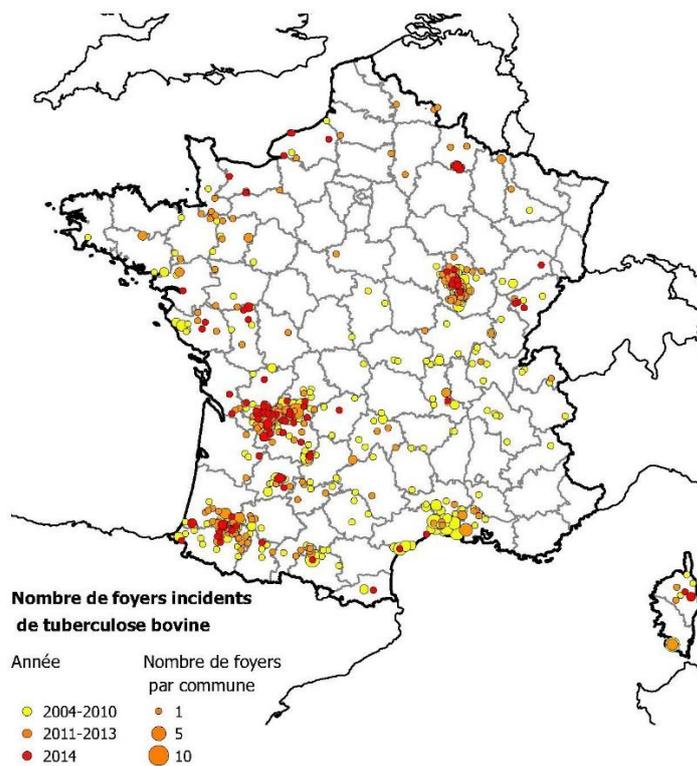
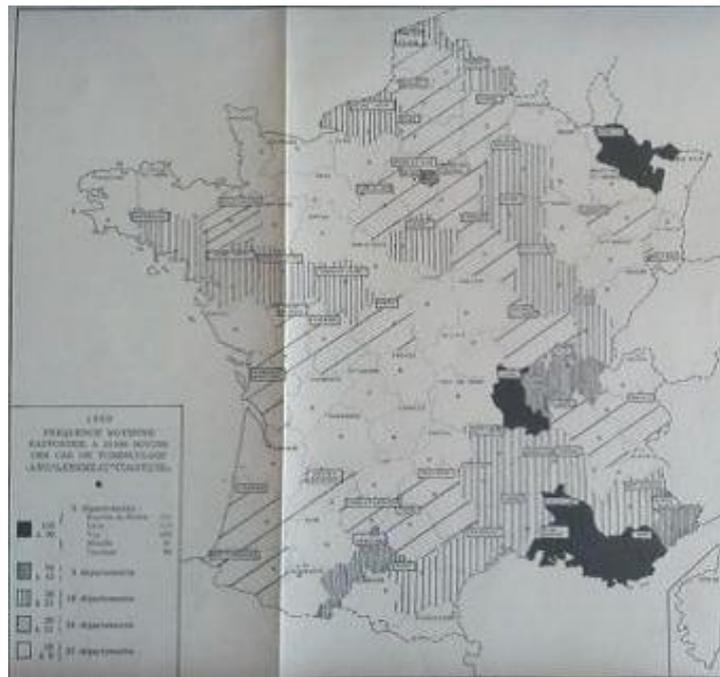


Figure 10: Incidence et distribution de la tuberculose bovine en France dans les années 50 (en haut) et entre 2000 et 2014 (en bas) (Cavalerie et al. 2014)

- Dans la faune sauvage

En France, à l'heure actuelle, la faune sauvage infectée n'est détectée qu'à proximité de foyers bovins. Le 1^{er} foyer de tuberculose bovine dans la faune sauvage a été découvert en 2001 dans la forêt de Brotonne (Seine-Maritime et Eure) sur des cervidés, puis des sangliers (Hars et al. 2010; Zanella et al. 2008). L'aggravation de la situation sanitaire en 2005-2006 a nécessité un abattage total des cerfs, considérés comme réservoir primaire de l'infection, ainsi qu'une diminution de la densité des sangliers, réservoir secondaire (Zanella et al. 2008). D'autres départements comme la Côte d'Or, la Corse, les Pyrénées Atlantiques, la Dordogne et la Charente notamment ont par la suite détecté des animaux sauvages infectés, essentiellement blaireaux, sangliers et dans une moindre mesure cervidés, avec toutefois des situations épidémiologiques très différentes selon les régions touchées. Ces situations dépendent de la population animale impliquée (espèces, densités, interactions...) et de l'environnement (climat, paysage...). Dans tous les cas, le génotypage (spoligotype et VNTR) des souches incriminées dans la faune sauvage a montré qu'elles étaient identiques à celles retrouvées dans les élevages bovins voisins, suggérant un lien épidémiologique entre cas domestiques et sauvages (Zanella et al. 2008; Payne et al. 2012; Richomme et al. 2010).

Depuis 2011, un réseau de surveillance épidémiologique de la tuberculose bovine dans la faune sauvage appelé Sylvatub a été mis en place en France. Les différentes modalités de surveillance ont pour but la détection de l'infection chez les animaux sauvages dans les zones à risque et présumées indemnes, ainsi que le suivi de son évolution afin de proposer des mesures de lutte aux autorités sanitaires (Rivière et al. 2011). La surveillance est basée sur un classement du territoire national en 3 niveaux de risque. Pour les zones situées en risque 1 (risque faible correspondant à une absence de bovins détectés), il est demandé aux chasseurs de signaler toute lésion suspecte lors de l'examen initial de la venaison. Concernant les zones où il existe un risque avéré (niveau 2 ou 3), la surveillance peut être à la fois événementielle (ramassage et analyse des cadavres d'animaux trouvés morts) et/ou programmée (analyse des cerfs et sangliers tués à la chasse et les blaireaux piégés). Les résultats des analyses effectuées en 2013-2014 sont présentés dans la Figure 11.

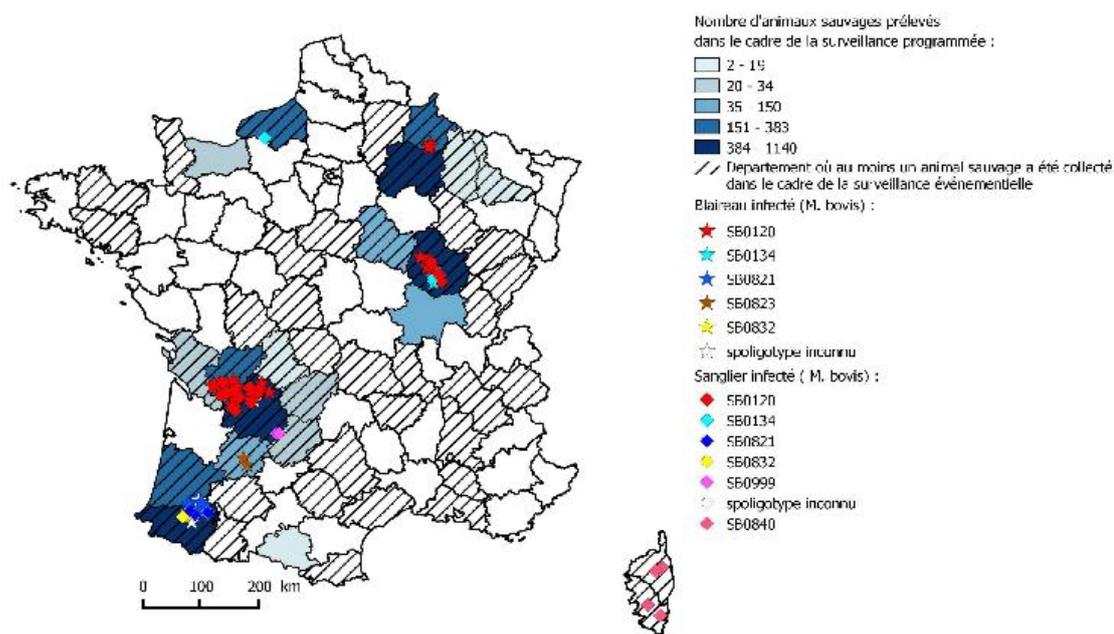


Figure 11 : Répartition et résultats des analyses effectuées dans le cadre du dispositif Sylvatub chez le grand gibier d’août 2013 à août 2014 et chez les blaireaux en 2014 (Source Sylvatub)

(3) Evolution de la situation sanitaire en Côte d’Or

- Quelques généralités sur l’élevage bovin en Côte d’Or

La Côte d’Or est un département d’élevage bovin principalement allaitant (231 270 têtes en 2013, dont 74 565 vaches allaitantes et 15 687 vaches laitières). L’élevage allaitant est majoritairement concentré dans les zones herbagères de l’ouest du département et l’élevage laitier sur le plateau de Langres, au nord de Dijon. L’élevage allaitant est extensif (les bovins sont au pré d’avril à octobre), lié à la production de broutards maigres destinés à être engraisés principalement en Italie. En Côte d’Or, le parcellaire des exploitations de bovins allaitant est souvent très morcelé.

- Situation épidémiologique chez les bovins et mesures de lutte associées

Historiquement, la Côte d’Or est un département en prise avec la tuberculose depuis de nombreuses années (Figure 10). A la fin des années 50, le taux de prévalence annuel chez les bovins atteignait 65%. Les mesures de lutte collective mises en place ont permis d’abaisser ce taux en dessous du seuil des 10% en 1969, puis de le faire diminuer lentement et régulièrement jusqu’en 1985 où la maladie semblait éradiquée. A la fin des années 90, les mesures prophylactiques ont cessé dans le

département et la vigilance vis-à-vis de la maladie a baissé (Communication personnelle, DDPP 21).

Les premiers signes d'une nouvelle épizootie sont apparus en 2002 sur le canton de Pouilly-en-Auxois (zone Sud), puis en 2003 dans ceux de Venarey-Les-Laumes et Vitteaux (zone Nord) (Source : DDPP21). Localisée à quelques élevages à son début, la zone de l'infection s'est peu à peu élargie au cours du temps. Un plan de prophylaxie restreint aux communes infectées a été mis en place en 2002, puis élargi aux cantons en 2003 avec de plus, une surveillance des cheptels en lien épidémiologique avec les troupeaux infectés et ceux des communes dans lesquelles les bovins infectés avaient pâturé. Mais ces mesures n'ont pas suffi à limiter la progression de l'infection, puisque limité à moins de 5 par an jusqu'en 2006, le nombre de foyers est passé de 11 en 2007 à 17 en 2009 (Figure 13). Le renforcement de la lutte, comprenant notamment le dépistage annuel de tous les bovins de plus de 12 mois dans tout le département, a permis la découverte de 45 foyers en 2010, signe que l'infection circulait à bas bruit. De 2011 à 2013, le nombre de foyers a été divisé par 2, et pour l'année 2014, 10 foyers seulement ont été mis en évidence, ce qui semble conforter une maîtrise de l'épizootie (Figure 13).

En Côte d'Or, les foyers bovins sont circonscrits à une zone géographique bien délimitée dans le département et partagent le même spoligotype : *M. bovis* spoligotype SB0134 dans la zone Sud et *M. bovis* spoligotype SB0120 dans la zone Nord (Figure 12). Depuis 3 ans toutefois, les deux zones ont tendance à se télescoper à cause notamment de la découverte d'animaux sauvages infectés avec *M. bovis* SB0120 en zone Sud. Les deux spoligotypes ont déjà été retrouvés simultanément dans des cheptels infectés. Ces observations, associées à l'absence d'installation pérenne de la maladie dans des zones du départements où les concentrations de bovins sont aussi élevées que dans la zone infectée, soulèvent la question de l'existence de facteurs locaux assurant l'entretien et la propagation de l'infection entre les élevages bovins. Au vu du morcellement et de l'imbrication des pâtures, la contamination par voisinage est probablement le facteur primordial chez les bovins. Une étude récente (de type cas-témoin), réalisée dans des cheptels de Côte d'Or, de Dordogne et des Ardennes, a montré que les contacts de voisinage entre troupeaux étaient le facteur de risque principal d'infection des troupeaux (Marsot et al. Article soumis). Toutefois, la détection d'animaux sauvages à proximité de certains foyers bovins interroge sur le rôle potentiel de la faune sauvage infectée dans la contamination des bovins et dans la recontamination rapide de plusieurs cheptels après abattage total des bovins et vide sanitaire (Figure 13) (ANSES 2011).

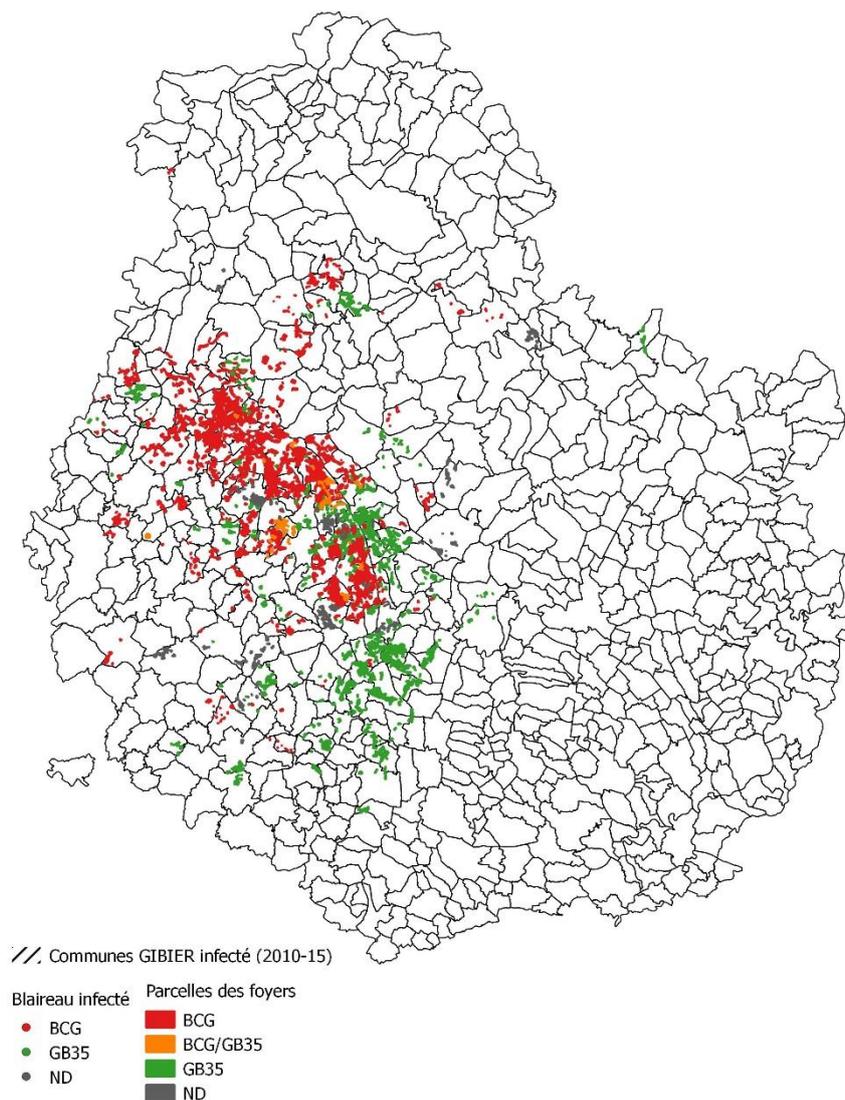


Figure 12 : Localisation du parcellaire des cheptels infectés par la tuberculose bovine entre 2010 et 2015 et spoligotypes incriminés (Source CIREV)

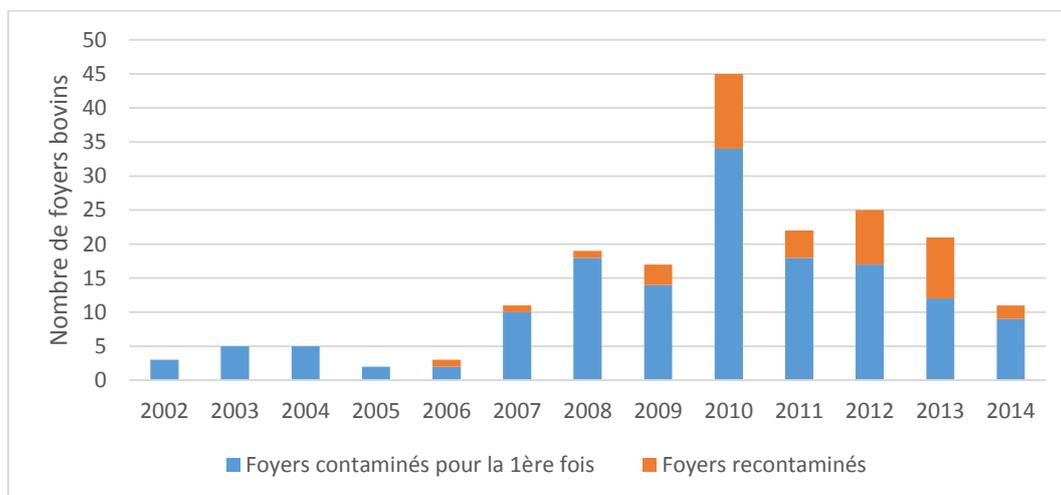


Figure 13: Nombre de nouveaux foyers bovins et de foyers recontaminés entre 2002 et 2014 (Données DDPP21)

- Situation épidémiologique dans la faune sauvage et mesures de lutte associées

Le premier animal sauvage infecté, une biche, a été découvert en 2003 à proximité de 2 foyers bovins de 2002 dans la zone Sud. Entre 2003 et 2007, la surveillance active de la faune sauvage mise en place et portée par l'ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage) et la DDPP, et sur le terrain par les chasseurs, les piégeurs et les vétérinaires, a permis de mettre en évidence l'infection chez 1 cervidé (n=284), 2 sangliers (n= 160), mais aucun blaireau (n=63). Depuis 2007, des sangliers infectés sont retrouvés tous les ans, notamment de jeunes animaux avec des lésions évolutives, majoritairement dans la zone Sud où les populations sont plus importantes. Depuis 2009, l'infection est retrouvée chez des blaireaux vivant à proximité des cheptels infectés, majoritairement dans la zone Nord (Hars, Richomme, and Boschioli 2010; DDPP21)(Figure 14). La maladie circule donc dans un système multi-hôtes complexe et unique incluant les bovins, les blaireaux, les sangliers et les cervidés (Payne 2014).

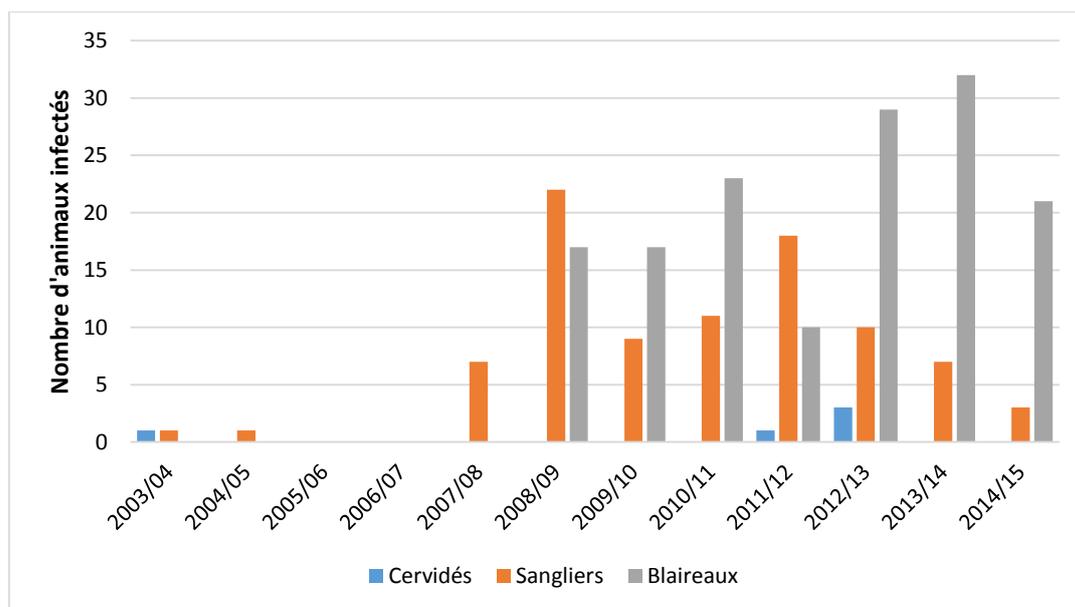


Figure 14 : Nombre de cervidés, sangliers et blaireaux infectés découverts en Côte d'Or entre 2002 et 2014

Dans la crainte de l'établissement d'un réservoir sauvage, chez le sanglier comme en Espagne (Naranjo et al. 2008) ou le blaireau au Royaume-Uni (Delahay et al. 2001), des mesures de diminution des densités ont été mises en place (augmentation des tableaux de chasse pour le sanglier et les cervidés et intensification du piégeage des blaireaux), le ramassage des viscères d'animaux tués à la chasse a été rendu obligatoire et l'agrainage interdit.

C. ECOLOGIE DE *M. BOVIS* DANS L'ENVIRONNEMENT

1. Introduction

Avant les années 30, il était admis *sine qua none* qu'en tant que bactéries intracellulaires obligatoires, les bactéries tuberculeuses ne survivaient pas en dehors de leur hôte. Toutefois, dès le début du 20^{ème} siècle, la détection de *Bacillus tuberculosis* virulent dans l'eau et les biofilms des canalisations d'effluents de différents sanatoria en Allemagne et au Royaume-Uni (Musehold en 1900 cité par Jensen 1954 et Conroy *et al* en 1921 et 1922 et Cummins et Ackland en 1929 cités par (Williams & Hoy, 1930) a soulevé la question du rôle potentiel de l'environnement dans l'épidémiologie des mycobactéries tuberculeuses. Concernant la tuberculose bovine, les différentes recherches menées pour détecter et caractériser la persistance de *M. bovis* dans l'environnement ont pour objectif principal de préciser le rôle de la transmission indirecte dans l'épidémiologie de la maladie. La transmission indirecte semble en effet prendre toute son importance lorsque des réservoirs sauvages sont identifiés et/ou des systèmes multi-hôtes, car ils ont la capacité de transmettre l'infection aux bovins (Corner 2006; Payne 2014).

Répondre à cette question nécessite de connaître les modalités de transfert des bactéries de l'animal ou l'homme infecté vers l'environnement, la durée de survie dans les différentes matrices, les stratégies de survie de la bactérie ainsi que les facteurs qui affectent sa survie.

2. Origines de la contamination environnementale par *M. bovis*

a. L'excrétion animale de *Mycobacterium bovis*

L'homme et les animaux infectés ont la capacité d'excréter le bacille *via* différentes voies et constituent donc une source de contamination potentielle pour l'environnement. Comme nous l'avons indiqué précédemment, les voies d'excrétion ainsi que les niveaux d'excrétion dépendent de la localisation des lésions et de leur sévérité. Les tableaux lésionnels décrits précédemment indiquent que *M. bovis* est susceptible d'être excrétée principalement par voie orale ou nasale lors d'atteinte pulmonaire et/ou des nœuds lymphatiques céphaliques, par voie digestive *via* les matières fécales et par voie urinaire lors d'infection généralisée (Phillips *et al.* 2003; Corner *et al.* 2012). L'excrétion fécale de bactéries du MTBC, en l'absence de lésions gastro-intestinales, semble majoritairement liée au passage de mucus respiratoire chargé en bacilles dans le tube digestif. La résistance aux pH acides (Vandal *et al.* 2008) des bactéries du MTBC leur permet de résister au passage du tractus digestif et d'être excrétées sous forme viable dans les matières fécales, comme cela a été démontré pour *M. bovis* dans certaines espèces animales (Corner, Murphy, and Gormley 2011; Gallagher and Clifton-Hadley

2000; Gavier-Widen et al. 2001), pour *M. tuberculosis* (El Khéchine et al. 2009) et *M. africanum* (Cadmus et al. 2009).

Chez les bovins : l'excrétion du bacille a été démontrée dans le mucus nasal et trachéal, et les fèces d'animaux infectés expérimentalement, (Neill et al. 1988; McCorry et al. 2005; Phillips et al. 2003; Maddock 1936). Le délai d'excrétion après l'inoculation, la durée de l'excrétion (plusieurs semaines) et la quantité de bacilles excrétés sont proportionnels à la dose infectieuse utilisée (Neill et al. 1988). L'excrétion fécale apparaît peu fréquente et intermittente chez les bovins (Neill et al. 1988; Goodchild & Clifton-Hadley 2001). Dans les pays industrialisés où le dépistage des animaux infectés est en place, l'excrétion de *M. bovis* dans le lait, les fèces et les urines est considérée comme insignifiante chez les bovins (Morris et al. 1994).

Chez le blaireau infecté naturellement ou expérimentalement, *M. bovis* est excrétée par 25 à 50 % des animaux par voie respiratoire (mucus trachéal et aérosols), urinaire et fécale, ainsi que par la suppuration d'abcès résultant de morsures (Corner et al. 2011; Delahay et al. 2000; Clifton-Hadley et al. 1993). L'isolement de *M. bovis* dans des glandes salivaires de blaireaux suggère que la salive constitue également une voie possible d'excrétion du bacille (Payne 2014). Les blaireaux présentant un stade avancé de la maladie et des lésions macroscopiques semblent être les plus excréteurs en terme de durée et d'intensité d'excrétion (Corner et al. 2012; Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Jenkins et al. 2008), toutefois l'excrétion du bacille a été décrite chez des animaux sans lésions visibles (Jenkins et al. 2008; Gavier-Widén et al. 2009). Dans les stades avancés de la maladie, les quantités excrétées peuvent atteindre 2.10^5 UFC.mL⁻¹ de mucus bronchique, $2,5.10^5$ UFC.mL⁻¹ d'urine et $7,5.10^4$ UFC.g⁻¹ de fèces (Gallagher et al. 1998). Le bacille est excrété par voie fécale de 165 à 1305 jours avant la mort de l'animal (Little et al. 1982). Dans cette espèce, l'excrétion est généralement intermittente, mais des individus « super excréteurs » ont été décrits et se caractérisent par une excrétion persistante dans le temps ou par l'excrétion du bacille par plusieurs voies simultanément (Delahay et al. 2000). Des blaireaux « super excréteurs » ont été mis en évidence en Côte d'Or, la voie fécale étant toujours positive chez ces animaux (Payne 2014). L'intensité de l'excrétion semble varier avec l'âge (les adultes excrètent plus que les jeunes) et la saison, puisque l'excrétion semble supérieure au printemps et en été (Delahay et al. 2013; King, Murphy, James, Travis, Porter, Hung, et al. 2015).

Chez le sanglier, l'excrétion de *M. bovis* se produit par voie orale, nasale, fécale et urinaire (Martín-Hernando et al. 2007; Santos, Almeida, et al. 2015; Barasona et al. 2015). L'excrétion salivaire est encore discutée (Payne 2014). En Espagne, l'excrétion par au moins une des voies a été mise en évidence par PCR sur 30 % des sangliers analysés (n = 39) et 25 des 39 animaux excrétaient par les trois voies (Barasona et al. 2015). L'excrétion était majoritairement associée à une maladie généralisée. Au Portugal, sur 39 sangliers adultes ou subadultes infectés analysés, 80 % excrétaient le bacille par au moins une voie et 13 % étaient des « super excréteurs » (excrétant par trois voies différentes). Environ

28 % des sangliers excrétaient des quantités de bacilles supérieures à 1 000 UFC par g ou mL d'excréta par au moins une voie (Santos, Almeida, et al. 2015). Chez le sanglier, à notre connaissance, l'excrétion n'a jamais été décrite en l'absence de lésions.

Chez les cervidés, différentes études ont montré que le bacille était excrété de façon très sporadique dans les mucus nasal, oro-pharyngé et trachéal, ainsi que dans les matières fécales lors d'infections naturelles ou expérimentales (Lugton et al. 1998; Santos, Almeida, et al. 2015; Palmer et al. 2001). Dans cette espèce, une excrétion intermittente apparaît dès les premiers stades de la maladie ; la sévérité des tableaux lésionnels rencontrés explique le niveau d'excrétion élevé (Palmer et al. 2001; Santos, Almeida, et al. 2015).

Les carcasses d'animaux infectés peuvent constituer une source d'infection directe pour les animaux charognards qui s'en nourrissent, mais également une source de contamination indirecte pour les bovins qui pâturent sur le site de décomposition de la carcasse (Morris et al. 1994). Concernant les animaux tués à la chasse, l'abandon des viscères ou leur ensevelissement représente également un risque pour les animaux charognards. De ce fait, en France, la collecte et l'élimination des viscères des espèces sensibles sont obligatoires dans les zones touchées par la tuberculose bovine.

b. Le transfert de *Mycobacterium bovis* par les effluents d'élevage ou urbains

Les études sur la contamination potentielle des effluents d'élevage avec *M. bovis* sont très rares, probablement à cause de la difficulté à cultiver le bacille dans ces matrices complexes. Les multiples voies d'excrétion du bacille et plus particulièrement l'excrétion par voie fécale, même si elle est intermittente, peuvent probablement contribuer à la contamination des effluents d'élevage bovin, tels que les fumiers, lisiers et eaux usées. L'épandage de ces effluents sur les pâtures ou l'irrigation des cultures peut constituer un vecteur de contamination du sol, des cultures et de l'eau, profonde ou de surface et représenter un risque pour les animaux et l'homme, mais aucune donnée chiffrée n'existe pour ces matrices en conditions naturelles. L'abattage et la découpe de bovins tuberculeux peut également représenter une source de contamination des rejets d'abattoir (Jensen 1954). Au vu des mesures actuelles de collecte, stockage, traitement et contrôle des effluents d'abattoir, cette contamination semble très peu probable en France. Toutefois, elle reste complètement valable dans les zones d'endémie des pays n'appliquant pas ces mesures et ne disposant pas de structures d'abattage adéquates.

Il est intéressant de noter que quelques études sont disponibles concernant la contamination d'effluents urbains avec *M. tuberculosis*. Jensen (1954) a montré que les effluents bruts de sanatoria de 5 villes des Pays-Bas, les effluents purifiés, les boues digérées et les boues séchées (prélevées 5 semaines après l'épandage) contenaient des bacilles virulents de *M. tuberculosis*. Plus récemment, la

mise en culture de 800 échantillons d'eau et 700 échantillons de sol, prélevés dans 3 quartiers de Téhéran (Iran) entre 2012 et 2014, a démontré la présence de *M. tuberculosis* dans 71 des échantillons d'eau (8,8%) et 11 échantillons de sol (1,5%). Les échantillons d'eau contaminés ont été retrouvés principalement dans les rigoles de ciment acheminant les eaux usées et pluviales (56/71) et dans les eaux traitées (15/71). La bactérie n'a toutefois pas été isolée du réseau d'eau potable. Environ 10% des souches isolées étaient multi-résistants aux antibiotiques (Velayati et al. 2015).

3. Détection et survie de *Mycobacterium bovis* dans l'environnement

a. Détection de *Mycobacterium bovis* en conditions naturelles

A ce jour, peu d'études concernant la détection de *M. bovis* dans des substrats naturellement contaminés ont été publiées. La détection de *M. bovis* dans des échantillons environnementaux naturellement contaminés grâce à des méthodes basées sur la culture est exceptionnelle. A Woodchester Park, dans le Gloucestershire (Sud-Ouest de l'Angleterre), où les densités de blaireaux sont élevées et la prévalence importante (20 % en 2000 et 35 % en 2005), un suivi longitudinal du statut des populations est réalisé depuis 1980 (Delahay et al. 2000) et différentes campagnes de prélèvements de sols de terriers et de latrines ont été réalisées. Le traitement d'échantillons de sol et latrines provenant de Woodchester Park traité par immunocapture magnétique a permis pour la première et seule fois l'isolement de *M. bovis* par culture dans des échantillons environnementaux (Sweeney et al. 2006; Sweeney et al. 2007). Cette technique est toutefois peu applicable à un grand nombre d'échantillons, en termes de coût et de temps, et n'a jamais été réutilisée par la suite.

D'autres tentatives de détection de *M. bovis* par différentes méthodes basées sur la culture dans des zones endémiques de tuberculose bovine, ont échoué, malgré le grand nombre d'échantillons environnementaux prélevés (Pillai et al. 2000; Fine, Bolin, et al. 2011; Iivanainen et al. 1999; Williams & Hoy 1930a; Little et al. 1982). La détection de *M. bovis* dans des échantillons environnementaux par la culture est compliquée par la nature des échantillons analysés, en effet ces derniers (sol, sédiments, eau stagnante, matières fécales, etc.) contiennent des micro-organismes très divers et abondants. La croissance de *M. bovis* étant très lente, les organismes à croissance rapide contaminent rapidement les milieux de culture compliquant voire empêchant l'isolement de la bactérie. Des traitements de décontamination préliminaires sont indispensables pour éliminer cette microflore, mais la décontamination réduit en général fortement la viabilité de *M. bovis*, réduisant aussi la sensibilité des méthodes basées sur la culture (Fine, Bolin, et al. 2011). Des microorganismes voisins des mycobactéries et présents dans les sols peuvent également résister aux procédés de décontamination et être retrouvés dans les isollements. De plus, l'intermittence et le faible niveau d'excrétion chez les

animaux infectés, associés au volume limité des prélèvements analysés diminuent les chances de détection de *M. bovis* dans l'environnement (Fine, O'Brien, et al. 2011). L'amélioration des protocoles de traitement des échantillons avant la culture est fondamentale pour l'isolement des souches environnementales.

Le développement des outils moléculaires a permis de contourner les inconvénients liés aux techniques basées sur la culture décrits précédemment. En Irlande, l'analyse de prélèvements réalisés en 2000 dans un élevage bovin touché plusieurs fois par la tuberculose a mis en évidence par des méthodes moléculaires la présence de 1×10^3 à $2,5 \times 10^3$ copies de gènes cibles de *M. bovis* (*mpb64* et *mpb70*) dans des pâtures et des sols d'entrée de terriers de blaireaux adjacents aux pâtures (Young et al. 2005). La répétition des analyses 30 mois plus tard en novembre 2002 a donné le même résultat sur les terriers bien qu'ils soient restés inhabités. Le rôle des blaireaux dans la contamination des bovins est fortement suspecté dans cette ferme. En Angleterre, l'analyse moléculaire de prélèvements environnementaux (terriers et latrines) réalisés en 2003 autour ou dans les pâtures d'élevages bovins infectés, dans six zones endémiques de tuberculose bovine, a mis en évidence *M. bovis* dans les sols de terriers de blaireaux de 78 % des fermes analysées (n=60). Dans chaque ferme, 47 % des terriers et 29 % des latrines analysés étaient positifs en PCR, une forte proportion était accessible aux bovins (Courtenay et al. 2006).

Entre 2004 et 2013, l'analyse par détection moléculaire de latrines appartenant à des groupes sociaux de blaireaux infectés de Woodchester Park a montré que selon les études 13 à 100% des latrines étaient contaminées avec des quantités pouvant atteindre $1,1 \times 10^8$ copies de gènes par g de latrine (Courtenay et al. 2006; Travis et al. 2011; Sweeney et al. 2006). L'amplification de séquences ciblant l'ARNr 16S dans certains échantillons des études présentées ci-dessus suggère que les bacilles détectés étaient viables (Young et al. 2005; Courtenay et al. 2006), toutefois, la séquence de l'ARNr 16S ciblée étant spécifique de toutes les mycobactéries à croissance lente, les résultats sont à considérer avec prudence. Dans ces études, le nombre de blaireaux excréteurs et leur niveau d'excrétion sont fortement corrélés à la contamination des terriers et des latrines.

Dans le sud du Portugal, une étude récente dans une zone endémique a mis en évidence par PCR ciblant l'*IS6110* des bactéries du MTBC dans 38 des 248 échantillons prélevés dans des zones d'agrégation d'animaux domestiques et sauvages : zones d'abreuvement utilisées par les bovins et la faune sauvage (sédiments et eau d'étangs : 13/58 et 3/57 et de sources saisonnières 11/61), sol des zones de nourrissage des animaux (5/28), du sol de boutis de sangliers (4/16), ainsi que dans le sol des zones de nourrissage des vautours (1/19) et dans leurs fèces (1/9) (Santos, Santos, et al. 2015). L'utilisation d'une seconde cible PCR (RD12) a confirmé 4 échantillons comme positifs pour *M. bovis*/*M. caprae* (2 échantillons de sédiments d'étang, 1 de source et 1 de sol de nourrissage) sans pouvoir différencier les deux espèces. Le plus grand nombre d'échantillons positifs a été retrouvé au printemps (température

moyenne de 16°C).

La PCR permet d'obtenir un résultat rapide avec une spécificité acceptable. L'analyse d'échantillons de sol, d'eau, de foin et de maïs inoculés avec *M. bovis* par une méthode basée sur la culture et la PCR a montré que cette dernière permet de détecter l'ADN de *M. bovis* dans l'échantillon sur une plus longue période après la contamination que la culture, indépendamment du substrat (Adams et al. 2013). Toutefois, les seuils de détection élevés des systèmes spécifiques de *M. bovis* (de 4×10^4 à 5×10^5 par g ou mL d'échantillon : Tableau 3) limitent leur utilisation dans le screening d'échantillons environnementaux, pour lesquels la charge bactérienne est probablement inférieure au seuil de détection. Enfin, la technique PCR ne donne aucune information sur la viabilité et la virulence des bactéries détectées.

b. Durées de survie de *Mycobacterium bovis* en conditions expérimentales

Les études expérimentales sur la survie environnementale de *M. bovis* ont débuté dans les années 1930 en Angleterre dans l'objectif de préciser le rôle de l'environnement dans l'épidémiologie de la tuberculose bovine et d'améliorer les programmes d'éradication de la maladie (Maddock 1933; Maddock 1934; Maddock 1936; Williams & Hoy 1930). *Mycobacterium bovis* et *M. bovis* BCG sont capables de survivre dans les fèces, les effluents, le sol et les divers excréta animaux de quelques jours à quelques mois, voire jusqu'à deux ans (). Les nombreuses conditions d'inoculation (concentration de l'inoculum, souche utilisée : *M. bovis* ou *M. bovis* BCG, origine de l'inoculum : culture ou broyat de lésions), la variété des matrices inoculées (matières fécales, urine, mucus, organes, sol, eau, etc.) et des conditions environnementales testées (conditions contrôlées de laboratoire ou exposition aux conditions climatiques) dans ces différentes études expliquent vraisemblablement de tels écarts de survie.

La compilation de toutes ces données indique que la température, l'exposition aux UV et l'humidité de la matrice semblent être les trois facteurs primordiaux intervenant dans la persistance de *M. bovis* quel que soit le substrat analysé. Il est montré que dans l'hémisphère Nord, la durée de survie de *M. bovis* est plus longue en automne, hiver et printemps (Williams & Hoy 1930; Tanner & Michel 1999; Fine, Bolin, et al. 2011; Duffield & Young 1985; Jackson et al. 1995), saisons caractérisées par des températures plus basses qu'en été, un ensoleillement minimal et une évapotranspiration par le couvert végétal limitée. Toutefois, Fine et al. (2011) ont montré que *M. bovis* pouvait survivre jusqu'à 48 jours dans l'eau en été malgré les températures élevées et l'ensoleillement. Les études réalisées en Afrique du Sud et en Nouvelle-Zélande, où les températures sont élevées sur de longues durées avec un ensoleillement important ont montré que la survie de *M. bovis* est améliorée lorsque le sol contient une humidité suffisante sous une exposition ombragée (Duffield & Young 1985; Tanner & Michel 1999).

L'exposition des bacilles aux UV diminue en effet fortement leur durée de persistance dans l'environnement (Williams & Hoy 1930a; Genov 1965; Fine, Bolin, et al. 2011) et la durée de survie est très prolongée lorsque les échantillons sont enterrés à quelques centimètres sous la surface du sol (Genov 1965). La survie de *M. bovis* est optimale dans les matières fécales, où le bacille est protégé dans un environnement humide à l'abri des radiations solaires, et minimale lorsqu'il est pulvérisé sur les végétaux et soumis aux UV et à la dessiccation (Maddock 1933; Van Donsel & Larkin 1977).

Tableau 1: Durées de survie de *M. bovis* dans différentes matrices environnementales obtenues en conditions expérimentales naturelles ou de laboratoire

Références	BCG	<i>M. bovis</i>	Matrices inoculées	Concentration de l'inoculum	Conditions	Méthodes de détection de <i>M. bovis</i>	Résultats de survie (virulence) de <i>M. bovis</i>
(Williams & Hoy 1930)		X	Fèces de bovin	Inconnue	Expérimentales (température fraîche, obscurité)	Injection sous-cutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	12 mois dans fèces naturellement infectées
				5.10^4 à 5.10^7 UFC			2 ans dans fèces artificiellement infectées
		X	Lisier de bovin	5000 UFC/cm ³	Expérimentales (température fraîche, obscurité)	Injection sous-cutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	Survie 4 mois avec diminution de la virulence du bacille au cours du temps
		X	Fèces de bovin	5.10^4 à 5.10^7 UFC	Environnementales (pâturage)	Injection sous-cutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	5 mois en hiver 4 mois en automne 2 mois au printemps, été 4 mois si protection UV en été 6 mois si protection insectes-vers en automne
(Maddock 1933)		X	Sol Sol + Fèces de bovin Bouse	Inconnue	Environnementales (pâturage)	Injection sous-cutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	178 j dans toutes les matrices
		X	Herbe	$1,2.10^5$ / 0,1 m ²	Environnementales (pâturage)	Injection sous-cutanée à des cochons d'Inde (cuisse)	14 jours
				$1,2.10^6$ / 0,1 m ²			28 jours
		120.10^6 / 0,1 m ²	49 jours				
(Maddock 1934)		X	Herbe	Inoculation mensuelle de 5 à 25.10^6 / 0,1 m ² répétée	Environnementales et expérimentales	Ingestion d'herbe contaminée	14/22 cochons d'Inde avec lésions

(Maddock 1936)		X	Veaux infectés (excrétion prouvée par injection à des cochons d'Inde)	Inconnue	Environnementales	Pâture séparée en 3 : 2 veaux mis 1 mois après le retrait des veaux infectés, 2 veaux 1 mois plus tard, 2 veaux 2 mois plus tard (laissés 3 sem.)	Aucun veau IDR + Aucune lésion tuberculeuse à l'autopsie
		X	Vache infectée (excrétion prouvée par injection à des cochons d'Inde)			Pâture séparée en 2 : 3 veaux mis 1 mois et 1/2 après le retrait de la vache infectée (laissés 53j), 3 veaux mis 1 mois plus tard (laissés 24j)	Abattage et autopsie 1 an plus tard : aucune lésion Bouses infectieuses 1 mois et 1/2 après retrait de la vache infectée, puis négatif 1, 2 et 3 mois plus tard. Sol et herbe sous bouses négatifs 3, 4 et 5 mois après retrait de la vache infectée
(Genov 1965)		X	Fèces de bovin Sang Urine		Environnementales	Culture	150 à 332 jours à 12-24°C sans d'UV 18 à 31 jours à 24-34°C avec UV 2 ans si enterré dans sol à 5 cm 11 mois si enterré à 1 cm 452 et 469 jours dans eau/bouse et eau/urine
(Van Donsel & Larkin 1977)	X		Effluents animaux Boues d'épuration		Environnementales		Abattage 90% en 11 jours pour sols arrosés avec effluents, 8 jours avec boues Isolement après 4 à 6 jours sur des radis et jusqu'à 35 jours sur des laitues
Anon 1979 cité par (Morris et al. 1994)			Excrétas de blaireaux conservés dans un terrier		Environnementales	Culture	Urine : 3 jours en été, 28 jours en hiver Mucus bronchique : 7 et 70 jours Fèces naturellement infectés : 14 et 28 jours
(Little et al. 1982)			Sol, foin, litière et eau de blaireaux inoculés	Inconnue	Expérimentales	Culture	1 culture positive (eau d'un abreuvoir)

(Duffield & Young 1985)			Sol sec stérile ou non Sol 30% humidité stérile ou non Fèces			Culture	<8 semaines dans sols secs ou humides non stériles avec 80% ombre (34°C), obscurité (32°C) et dans labo (23°C) <8 semaines dans sol humide stérile avec 80% ombre et obscurité Pas de survie plein soleil (43°C) dans sols et fèces
(Tanner & Michel 1999)			Lésions pulmonaires ou ganglionnaires de buffle Fèces de bovin inoculées	8.10 ⁷ UFC/ 50g fèces		Culture	Poumon : 42 jours en hiver à l'ombre dans sol humide ou sec (20°C) Fèces : 28 jours en hiver au soleil dans sol humide ou sec
(Jackson et al. 1995)		X	Rubans de coton	Environ 10 ⁶ UFC/ ruban	Environnementales (rubans déposés dans terriers de possum et sols de pâtures ou de forêt)	Culture	2 jours sur les sols de pâtures 14 jours sur les sols forestiers et dans les terriers de possum
(Scanlon & Quinn 2000b)		X	Lisier bovin stérilisé	6,5 × 10 ³ UFC/mL	Expérimentales	Culture	171 jours (concentration finale : 2 UFC/mL)
(Young et al. 2005)	X		Sol stérile et non stérile	10 ⁸ UFC/ g sol	Expérimentales (4, 15, 25, 37°C)	PCR pour les sols non stériles Culture pour les sols stériles	Survie à 60 jours optimale à 37°C à -20kPa d'humidité dans le sol stérile Détection d'ARNm pendant 15 mois (sol stérile)
(Palmer & Whipple 2006)		X	Betterave, pommes, carottes, pommes de terre, maïs, foin	1,1 × 10 ⁶ UFC/10g	Expérimentales (-20, 8 et 23°C)	Culture	112 jours à -20°C pour tous les substrats 112 jours à 8°C pour pommes, maïs, foin et pdeterre 112 jours à 23°C pour pommes, maïs et pdeterre
(Fine, Bolin, et al. 2011)		X	Sol, foin, maïs, eau	5,0 × 10 ⁴ UFC/échantillon	Environnementales	Culture	88 jours dans le sol en hiver/printemps 58 jours dans l'eau, 43 jours dans le foin et 37 jours dans le maïs en automne/hiver

(Ghodbane et al. 2014)		X	Sol stérile	10 ⁸ UFC/ g sol	Expérimentales (18 à 24°C, obscurité)	Culture	Survie 12 mois (concentration finale : 150 UFC/g sol) Virulence conservée sur souris
-------------------------------	--	---	-------------	----------------------------	---	---------	---

Dans les fèces d'animaux, *M. bovis* survit jusqu' à 2 ans dans les bouses de bovins en conditions de laboratoire (Williams & Hoy 1930) et de 14 jours à 6 mois lorsque les fèces sont exposées dans les pâtures (Williams & Hoy 1930a; Genov 1965; Morris et al. 1994; Tanner & Michel 1999). Dans les effluents d'élevages contaminés, il a été montré que *M. bovis* survivait de 4 mois dans du lisier en conditions de laboratoire (Williams & Hoy 1930a) et jusqu'à 171 jours dans du lisier stérilisé conservé à température ambiante et à l'obscurité (Scanlon & Quinn 2000b). L'épandage d'effluents ou de boues inoculées avec *M. bovis* BCG sur des cultures de radis et laitue a montré la réduction de 90% des bacilles en respectivement 11 et 8 jours. *M. bovis* a toutefois été isolée de façon sporadique 35 jours après arrosage (Van Donsel & Larkin 1977).

Dans le sol, les durées de survie les plus longues pour *M. bovis* et *M. bovis* BCG ont été observées dans du sol stérile (63 % de sable, pH : 6,5-6,8) et en conditions de laboratoire (Young et al. 2005; Ghodbane et al. 2014). Young *et al.* (2005) ont amplifié l'ARNr 16S de *M. bovis* BCG jusqu'à 15 mois après inoculation du sol, alors que Ghodbane *et al.* (2014) ont cultivé *M. bovis* après 12 mois de séjour dans le sol (pH : 8,3). Dans les conditions environnementales, Fine *et al.* (2011) ont confirmé l'effet de la saison sur la survie de *M. bovis* dans le sol, sur du maïs et du foin avec une survie maximale en hiver/printemps (février-mai, température moyenne : 2,9°C, radiations solaires : 80,0 W.m²), une survie de 34 jours en automne/hiver (novembre-janvier, température moyenne : 0,4°C, radiations solaires : 24,3 W.m²) et une survie minimale de 12 jours pendant la période printemps/été (mai-août, température moyenne : 21,7°C, radiations solaires : 150,0 W.m²). De façon contradictoire, l'étude de Young et al. (2005) a mis en évidence une durée de survie optimale (60 jours) de *M. bovis* BCG à 37°C et minimale (16 jours) à 4°C.

La survie de *M. bovis* a également été mise en évidence par méthode culturale sur différents aliments du bétail (Palmer & Whipple 2006; Fine, Bolin, et al. 2011). Après 112 jours, la bactérie est cultivée sur tous les substrats inoculés conservés à -20°C (betteraves, pommes, carottes, pommes de terre, maïs et foin), sur les pommes, le maïs, le foin et les pommes de terre conservés à 8°C et uniquement sur les pommes, le maïs, et les pommes de terre conservés à 23°C (Palmer & Whipple 2006). Fine et al. (2011) ont également montré que *M. bovis* survivait plus longtemps en automne/hiver sur du maïs (43 jours) et du foin (37 jours) qu'à la période printemps/été (survie inférieure à 3 jours).

La bactérie peut également survivre entre 2 et 6 semaines dans des lésions tuberculeuses macroscopiques de poumons et nœuds lymphatiques de buffle (Tanner & Michel 1999), la survie optimale étant observée en hiver dans des situations ombragées et humides. Des résultats identiques sont observés pour des échantillons d'urine (3 jours en été vs 28 jours en hiver) et des sécrétions bronchiques (7 jours vs 70 jours) (Morris et al. 1994).

Les différentes études présentées ci-dessus démontrent que *M. bovis* survit un temps variable dans

l'environnement une fois excrété par son hôte. Ce temps est fonction de l'excréta et du substrat qui le reçoit, de sa charge bactérienne et des conditions climatiques. Il existe donc une période, appelée fenêtre temporelle critique pendant laquelle les animaux qui interagissent avec les matrices contaminées par des bacilles viables présentent un risque accru d'infection. Comme nous l'avons vu précédemment, la fenêtre temporelle critique est fortement dépendante du pays ou de la région étudiés et des conditions climatiques.

Très peu de données existent sur la conservation de la virulence de *M. bovis* après un passage en dehors de son hôte. La virulence du bacille a été confirmée par injection à des cobayes dans des fèces de bovins naturellement contaminées après 178 jours d'exposition dans une pâture et après 12 mois d'incubation en conditions de laboratoire (Maddock 1933). L'étude récente de Ghodbane et al. (2014) a démontré que *M. tuberculosis*, *M. canetti* et *M. bovis* conservaient leur virulence après un séjour de 12 mois dans le sol. En effet, l'injection intra-péritonéale de suspensions bactériennes à des souris a entraîné l'apparition de lésions avec *M. canetti* (nodules sur les poumons, le foie et la rate) et *M. tuberculosis* (nodules sur les poumons et la rate). Malgré l'absence de lésions lors de l'injection de *M. bovis*, la bactérie a pu être isolée en quantité importante des 3 organes. Toutefois, les injections étaient réalisées avec les colonies de mycobactéries obtenues après culture sur milieu gélosé induisant un biais important. De plus, l'ingestion par des souris de sol inoculé par *M. tuberculosis* après 12 mois d'incubation a provoqué des lésions pulmonaires (1 souris/5) et des lésions de la rate (2/5), mais la bactérie a pu être cultivée à partir des poumons, de la rate, de l'estomac et de l'intestin chez toutes les souris.

4. Stratégies de survie des mycobactéries dans l'environnement

L'enveloppe particulière des mycobactéries décrite précédemment est probablement un des facteurs majeurs de la résistance de *M. bovis* en dehors de son hôte dans des conditions environnementales défavorables. D'autres stratégies de survie sont probablement mises en jeu par *M. bovis* pour persister dans l'environnement mais sont totalement inconnues à ce jour. Les mycobactéries pathogènes et opportunistes ont développé différents mécanismes pour survivre à l'intérieur des cellules de l'hôte, stratégies qui peuvent également être utilisées en dehors de l'hôte. Les mécanismes moléculaires de certains processus sont également en cours de compréhension. Les principales stratégies de survie sont présentées dans la partie suivante.

a. L'état de dormance

La dormance est définie chez les bactéries non sporulées comme un état physiologique

réversible permettant la survie de la bactérie pendant une longue période sans croissance ni réplication (Kaprelyants et al. 1993). Le programme génétique de la bactérie lui permet d'entrer en dormance (en anglais : Non-Replicating Persistence) lorsque les conditions extérieures deviennent défavorables (notamment en conditions oligotrophiques) puis de retrouver sa capacité à se diviser lorsque les conditions redeviennent favorables. La dormance est décrite chez plusieurs espèces de mycobactéries. L'entrée en dormance de *M. smegmatis* (Dick et al. 1998), *M. bovis* (Lim et al. 1999; Boon et al. 2001) et *M. tuberculosis* (Wayne & Hayes 1996) en culture est provoquée par la raréfaction de l'oxygène. L'état de dormance est suggéré chez Map et pourrait expliquer sa longue survie dans le fumier, le lisier et le sol (Whittington et al. 2004). L'état de dormance est également décrit chez *M. avium* (Archuleta et al. 2005).

Chez les mycobactéries, l'entrée en état de dormance est contrôlée par le facteur de transcription DosR (Dormancy Survival Regulator) (Boon & Dick 2002). Composé de 48 gènes (Schnappinger et al. 2003; Flores Valdez & Schoolnik 2010), son expression est activée *in vitro* par l'oxyde nitrique (NO) (Voskuil et al. 2003), le monoxyde de carbone (CO) (Shiloh et al. 2008), le déficit en nutriments (Rodriguez et al. 2008) et l'hypoxie (Rodriguez et al. 2008). L'expression de ce régulon a été démontrée lors d'infection expérimentale de macrophages (Schnappinger et al. 2003; Rodriguez et al. 2008) et d'animaux modèles (Voskuil et al. 2003) pour *M. tuberculosis* et dans des nœuds lymphatiques de bovins positifs en IDR pour *M. bovis* (Jiménez et al. 2013). Ce régulon permettrait non seulement la survie de la bactérie pendant la phase de dormance, mais aussi la transition de la respiration aérobie à l'anaérobiose et inversement (Leistikow et al. 2010). A l'heure actuelle, le rôle de certaines protéines codantes et d'ARN non codants de ce régulon demeure toujours inconnu. Une étude génomique comparative a permis de constater que le régulon de la dormance était conservé chez les différentes espèces de mycobactéries, y compris chez les mycobactéries environnementales (Gerasimova et al. 2011). Cette donnée suggère que la dormance est une réponse adaptative probablement très ancienne chez les mycobactéries pour survivre dans des environnements où les concentrations en oxygène sont fluctuantes (Boon & Dick 2012) et que cette adaptation a été mise à profit par les mycobactéries pour survivre dans les cellules immunitaires des hôtes qu'elles infectent.

Aucune étude n'est à ce jour disponible concernant l'entrée en dormance potentielle de *M. bovis* dans l'environnement. Le sol constitue toutefois un environnement hostile où facteurs biotiques et abiotiques pourraient déclencher le passage de la bactérie d'un état actif à un état dormant (hypoxie, carence en nutriments, température, ...).

b. La sporulation

L'évocation de la sporulation chez les mycobactéries est très controversée. Ghosh *et al.* (Ghosh

et al. 2009) ont décrit la sporulation expérimentale de *M. marinum* sous forme d'endospores dans des cultures liquides âgées de 2 mois et dans des cultures solides de *M. bovis* BCG de 8 mois. Malgré des vérifications phénotypiques, biochimiques et génomiques démontrant que ces spores étaient bien issues de *M. marinum*, ces résultats ont été contestés par Traag *et al.* (Traag et al. 2010) qui ont échoué à les reproduire. Lamont *et al.* (Lamont et al. 2012) ont pour la première fois mis en évidence l'apparition de morphotype spore-like dans des cultures liquides de Map d'origine bovine (K-10), ovine (7565) et humaine âgées d'un an en conditions oligotrophiques. Le séquençage de l'ARNr 16S et l'amplification de l'IS900 spécifique de Map ont confirmé que les colonies bactériennes issues des spores correspondaient bien à Map. Le chauffage des spores obtenues à 70°C pendant 30 minutes ne semble pas affecter sa virulence sur les macrophages. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations. A notre connaissance, la sporulation n'a jamais été évoquée pour les mycobactéries du MTBC.

c. Interactions des mycobactéries avec la faune du sol

La microfaune et plus particulièrement les amibes libres sont largement présentes dans l'environnement et colonisent les écosystèmes aquatiques, le sol (Khan 2006; Rodríguez-Zaragoza 1994) et l'air. Elles ont été également isolées chez l'homme. Elles vivent préférentiellement dans les biofilms et aux interfaces eau-sol, eau-air et eau-plantes (Rodríguez-Zaragoza 1994) où elles « broutent » les bactéries, les champignons et les algues dont elles régulent les communautés (Huws et al. 2005). Les mycobactéries environnementales sont largement présentes dans les milieux aquatiques (Primm et al. 2004) où elles peuvent interagir avec les amibes. De nombreuses études rapportent la capacité des mycobactéries environnementales à survivre et se multiplier dans les trophozoïtes et/ou les kystes d'amibes (Adekambi et al. 2006; Drancourt et al. 2007; Ben Salah & Drancourt 2010; Krishna-Prasad & Gupta 1978; Mura & Bull 2006). Les amibes pourraient même constituer un véritable réservoir pour *M. xenopi* (Drancourt et al. 2007; Thomas et al. 2006).

La plupart des mycobactéries pathogènes, y compris *M. bovis*, sont capables de survivre dans les amibes, voire de s'y multiplier (Thomas & McDonnell 2007; Mba Medie et al. 2011; Greub & Raoult 2004; Cirillo et al. 1997; Adekambi et al. 2006). La survie de *M. bovis* a été confirmée dans les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba castellanii* jusqu'à 5 mois après infection en conditions expérimentales (Taylor et al. 2003; Mardare et al. 2013). La virulence vis-à-vis des macrophages humains et des cellules intestinales de souris semble être exacerbée par la répllication intra-amibienne (Cirillo et al. 1997). En conditions naturelles, l'observation de protozoaires isolés de latrines de blaireaux infectés a mis en évidence des BAAR sans pouvoir identifier précisément *M. bovis* (Mardare et al. 2013). Des études complémentaires sont nécessaires pour préciser le rôle de réservoir éventuel

des amibes pour *M. bovis*. Les interactions des mycobactéries pathogènes avec les amibes pourraient être du même ordre que celles avec les macrophages de l'hôte infecté, notamment au niveau des mécanismes de pénétration (Danelishvili et al. 2007) et de l'inhibition de la fusion entre le phagosome et le lysosome, suggérant qu'une relation évolutive des mycobactéries avec les amibes auraient permis aux mycobactéries l'acquisition de ces caractéristiques de survie (Cirillo et al. 1997).

La localisation intra-amibienne des mycobactéries les protège des conditions environnementales défavorables, des biocides tels que le chlore (Adekambi et al. 2006; Whan et al. 2006), des antibiotiques (Miltner & Bermudez 2000), des différents traitements, comme l'ozonation de l'eau (Thomas et al. 2008) et favorise leur dissémination et leur implication potentielle dans des maladies humaines (Greub & Raoult 2004). Lors de la pénétration dans l'hôte, l'amibe joue un rôle de « cheval de Troie » (Barker & Brown 1994), protégeant les bactéries contre les premières défenses de l'hôte.

L'utilisation des amibes en co-cultures pour isoler des bactéries résistantes aux amibes dans des échantillons environnementaux et médicaux a permis d'isoler des mycobactéries d'écosystèmes aquatiques (Thomas et al. 2006; Thomas & McDonnell 2007; Pagnier et al. 2008) et de sols pollués (Wang et al. 2006).

Les études relatant les interactions entre *M. bovis* et la méso- et macrofaune sont rares. Une étude réalisée dans des élevages bovins et caprins infectés par Map a mis en évidence la contamination de 3,1 % des vers de terre prélevés sur les pâtures fréquentées par les animaux (Fischer et al. 2003). Dans cette étude, Map a été retrouvée dans le corps et les fèces de vers de terre 1 et 2 jours après l'ingestion de bouses infectées expérimentalement, suggérant qu'ils peuvent probablement jouer un rôle de vecteurs dans la dissémination des mycobactéries.

Les études disponibles, bien que très rares, suggèrent que la méso- et macrofaune du sol peuvent héberger et probablement jouer un rôle de vecteur des mycobactéries. Toutefois des études complémentaires sont indispensables concernant *M. bovis*.

d. Interactions des mycobactéries avec les diptères

Le portage digestif et fécal de *M. bovis* par des mouches communes (*Musca domestica*) en contact avec des viscères infectés de bovins est décrit. La bactérie survit de 12 jours sur leurs corps et 15 jours dans le tractus digestif de mouches mortes (Schlee 1957 cité par Kazda et al. 2009).

e. La formation de biofilms

L'aptitude à former des biofilms est connue pour de nombreuses espèces de mycobactéries

environnementales à croissance rapide comme *M. smegmatis*, *M. fortuitum* ou *M. abscessus* ou à croissance lente, notamment *M. avium* et *M. intracellulare* (Falkinham et al. 2001; Beumer et al. 2010; Torvinen et al. 2007). L'organisation des mycobactéries en biofilm leur confère une résistance accrue vis-à-vis des conditions défavorables dans l'environnement, mais également chez l'hôte humain où elles peuvent coloniser les cathéters et provoquer des infections sanguines très graves (El Helou et al. 2013). Concernant les mycobactéries du MTBC, la formation de biofilms est décrite pour *M. tuberculosis* dans des conditions expérimentales très particulières très éloignées des conditions naturelles (Kulka et al. 2012). La formation d'agrégats (clumping ou cording) observés lors de la culture des bactéries du MTBC en milieu liquide grâce à une matrice extracellulaire riche en acides mycoliques peut être assimilée à une forme organisée de résistance des bactéries, puisque sous cette forme les bactéries survivent à des concentrations très élevées en antibiotique (Ojha et al. 2008). Il a été montré chez *M. tuberculosis* que la formation de biofilms mettait en jeu des processus génétiques et physiologiques différents de la croissance planctonique (Ojha et al. 2008). Toutefois, comme il n'a jamais été démontré que ces bactéries se multiplient dans l'environnement, il semble peu probable que les biofilms constituent une forme de résistance pour *M. bovis*.

5. Facteurs de risque de contamination de l'environnement et de transmission de *Mycobacterium bovis* aux animaux par l'environnement contaminé

Plusieurs études portant sur les interactions entre bovins et faune sauvage ont montré que les contacts directs étaient très peu fréquents entre les bovins et les blaireaux (Benham & Broom 1989; Drewe et al. 2013; Böhm et al. 2009) ainsi qu'entre les cerfs, les sangliers et les bovins (Cooper et al. 2010; Kukielka et al. 2013). La transmission indirecte de *M. bovis* semble donc être le mode de transmission prépondérant entre la faune sauvage et les bovins, voire entre les différentes espèces sauvages (Cowie et al. 2015; Carrasco-Garcia et al. 2015). Différents facteurs de risque jouent un rôle sur ce mode de transmission qui nécessite un recouvrement des domaines vitaux des animaux sauvages infectés et excréteurs avec les sites d'élevage bovin (pâtures et bâtiments). Ces principaux facteurs de risque sont détaillés ci-dessous.

a. Risques liés à l'écologie des espèces sauvages sensibles à *Mycobacterium bovis*

Concernant le blaireau et le sanglier, les pâtures peuvent constituer une grande partie de leur domaine vital (Hutchings & Harris 1999; Payne 2014). Elles sont utilisées pour la recherche de

nourriture, essentiellement des lombrics qui représentent une part importante de leur régime alimentaire (Tolhurst et al. 2009; Cleary et al. 2011; Baubet et al. 2003). Une étude réalisée en Côte d'Or a montré que la fréquentation des pâtures par les blaireaux est optimale au printemps, période de mise au pré des bovins, par rapport à l'automne et à l'hiver. Pour les sangliers, la fréquentation des pâtures est plus importante au printemps et en été (Payne 2014).

Concernant plus précisément les blaireaux, ces derniers urinent et défèquent dans des latrines pour délimiter leurs territoires (Hutchings et al. 2001), mais ils urinent également sur les pâtures préférentiellement au niveau des lisières de forêt, des clôtures et des haies qu'ils croisent au gré de leurs déplacements dans un but de marquage (White et al. 1993; Drewe et al. 2013). Dans les pâtures, il a été montré que le taux de contact entre bovins et latrines est élevé (Hutchings & Harris 1997; Drewe et al. 2013). Dans l'étude de Hutchings et Harris (1997), 48 des 50 vaches du troupeau ont cumulé 416 contacts avec 4 latrines présentes dans la pâture étudiée et 33 animaux ont brouté sur les latrines (suivi sur 1776 heures). Pour Drewe *et al* (2013), 1716 contacts avec 13 latrines ont été enregistrés pour les 33 bovins d'un troupeau sur les cinq mois de l'étude. Toutefois, le rang hiérarchique des bovins du troupeau joue un rôle important, puisque les animaux dominés sont les plus enclins à brouter au voisinage des latrines. Enfin, les bovins consomment l'herbe au voisinage des latrines de façon plus importante lorsque l'herbe de la pâture est rase (en cas de surpâturage ou de fauchage) (Hutchings & Harris 1997). Compte tenu du grand nombre de bacilles qui peuvent être excrétés par la voie urinaire, du fort taux de contact bovins/latrines et de la consommation de l'herbe sur les latrines par certains bovins, il semblerait que les latrines et plus particulièrement les zones de marquage urinaire dans les pâtures représentent un risque important de transmission indirecte de la maladie par inhalation ou ingestion (Hutchings & Harris 1999).

Bien qu'il n'existe aucune étude sur le sujet, la contamination des pâtures par des blaireaux présentant des écoulements purulents de morsures a également été envisagée (Gallagher & Clifton-Hadley 2000).

Les blaireaux vivent dans des terriers qu'ils creusent dans le sol, en milieu forestier ou en dehors, notamment dans les pâtures. La contamination des sols d'entrée de terrier par *M. bovis* représente également un risque pour les bovins qui peuvent se contaminer en explorant les entrées de terrier localisées dans les pâtures, par ingestion ou inhalation de la litière expulsée des tunnels (Benham 1985). De plus, le sol excavé des tunnels par les blaireaux est attirant pour les bovins qui peuvent en ingérer pour combler des carences minérales (Dewes 1996) ou s'y frotter la tête, créant des aérosols de poussière potentiellement infectant (Phillips et al. 2003). La contamination des sols de terriers représente également un risque important de transmission de l'infection dans le groupe social de blaireaux qui partage le terrier. Le sol du terrier constitue un biotope adéquat pour la survie de *M. bovis*, à l'abri des UV, sans variation extrême de température et avec une humidité relative

importante (Moore & Roper 2003). L'entretien de la maladie dans un groupe social par le terrier contaminé a déjà été évoqué (Rogers et al. 2003).

La fréquentation des pâtures par les sangliers pour la recherche de nourriture constitue également un facteur de risque dans la transmission indirecte de la bactérie aux bovins. L'exploration du sol avec leurs museaux à la recherche de lombrics, larves et autre nourriture, ainsi que les reliquats de sol déplacés peuvent constituer un facteur de contamination potentiel de l'environnement par la déposition d'excrétas oro-nasaux infectés.

Les cervidés peuvent également utiliser les prés pour se nourrir et être une source de contamination indirecte pour les bovins (Brook & McLachlan 2009).

b. Risques liés aux pratiques d'élevage

Le séjour prolongé des bovins au pré est susceptible d'augmenter les contacts directs et indirects avec la faune sauvage infectée. L'élevage allaitant est caractérisé par une longue période de pâturage entre avril et octobre, puis une hibernation en bâtiments au moment des vêlages. Certaines races rustiques, notamment la race salers, qui ont repeuplé une partie des cheptels bovins infectés après abattage total, passent toute l'année au pâturage. Ces longues périodes de pâturage constituent un facteur de risque non négligeable pour les bovins qui partagent leur habitat avec des espèces sauvages infectées. Le surpâturage est également un facteur de risque pour les bovins, qui sont amenés à brouter les latrines de blaireaux et à ingérer des quantités de sol potentiellement contaminé plus importantes (Hutchings & Harris 1999).

Les zones d'abreuvement et de nourrissage des bovins dans la pâture constituent des zones attractives pour la faune sauvage, notamment l'hiver lorsque les ressources alimentaires font défaut. Le partage de fourrage entre bovins et cervidés est probablement une source de contamination des bovins dans le Michigan (O'Brien et al. 2006; Brook & McLachlan 2009; Brook et al. 2012), d'autant plus que la transmission indirecte de la maladie entre des cerfs et des veaux par le partage du foin a été prouvée expérimentalement (Palmer et al. 2010; Palmer et al. 2004). La fréquentation des auges de bovins et des zones de nourrissage au sol par les blaireaux qui viennent manger les reliquats alimentaires est régulièrement décrite au Royaume-Uni, ainsi que celle des réserves de grains, d'ensilage et de foin dans lesquels ils peuvent uriner et déféquer (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Ward et al. 2010). Les pierres à sel souvent posées au sol dans les prés attirent particulièrement les cervidés (Payne et al. 2015; Brook & McLachlan 2009). Les abreuvoirs et les zones d'abreuvement (trous d'eau, ruisseau, source) constituent également un facteur de risque lorsqu'ils sont utilisés par les bovins et la faune sauvage, la survie de la bactérie excrétée étant optimale dans les zones humides. Le comportement de baignade des sangliers dans les trous d'eau et les souilles entraîne une forte

fréquentation de ces zones, notamment en été (Payne 2014).

Finalement, l'épandage de fumiers frais augmenterait le risque d'infection d'un troupeau par rapport à l'épandage d'engrais ou de fumiers non frais (stockés au moins deux mois) ; les animaux se contaminant par inhalation ou ingestion de substrats contaminés dans les deux mois suivant l'épandage (Griffin et al. 1996; Humblet et al. 2009). Certaines préconisations conseillent un temps de stockage minimum des fumiers avant épandage (au moins 6 mois suite aux résultats de Scanlon et Quinn, 2000a et 2000b) ou leur traitement chimique (Scanlon & Quinn 2000b; Scanlon & Quinn 2000a), un compostage (McCallan et al. 2014) voire l'interdiction d'épandage de fumiers pour les cheptels infectés (Phillips et al. 2003).

c. Risques liés aux pratiques cynégétiques

Les zones d'agrégation des animaux sauvages, telles que les zones d'agraine ou de nourrissage à points fixes et la réalisation de trous d'eau artificiels pour l'abreuvement et la baignade des animaux sauvages sont des zones à risque, qui augmentent les interactions directes et indirectes entre les animaux et donc les risques de transmission de *M. bovis* entre eux (Corner 2006; Vicente et al. 2007; Delahay et al. 2002; Coleman & Cooke 2001). En Espagne, l'augmentation des densités d'ongulés sauvages (cervidés et sangliers) dans le Sud du pays a entraîné le développement d'activités de chasse à but commercial, amenant à la réalisation de parcs gigantesques pour contenir les animaux sauvages. Dans ces zones, l'agrégation des animaux sauvages de différentes espèces (sangliers, cervidés, cochons sauvages et bovins) autour des trous d'eau et des zones de nourrissage a favorisé la transmission intra- et interspécifique de la maladie (Vicente et al. 2007; Cowie et al. 2015). Chez le sanglier, la prévalence varie de 52 à 70 %, voire presque 100 % dans certaines populations (Gortázar et al. 2008; Naranjo et al. 2008). Cowie *et al.* (2015) ont montré que 40 à 66 % des interactions indirectes avaient lieu dans une fenêtre temporelle de 3 jours en saison sèche et 72 à 100 % dans une fenêtre temporelle de 12 jours en saison humide. Or, dans ces zones, la survie de *M. bovis* a été estimée à 3 jours pendant la saison sèche et à 12 jours pendant la saison humide (Kukielka et al. 2013), suggérant que si le pathogène est présent dans une population, l'agrégation est un facteur de maintenance et de dissémination de l'infection dans et entre les espèces. De plus, la présence d'élevages bovins à proximité de ces parcs de chasse entraîne une fréquentation importante des structures d'élevage par les animaux sauvages et un risque accru d'infection pour les bovins des élevages visités (Carrasco-Garcia et al. 2015).

Le nourrissage des cervidés dans le Michigan, dans le but de maintenir les populations pour la chasse, est la cause du maintien de l'infection dans les populations sauvages, qui se contaminent entre eux *via* les aliments distribués (O'Brien et al. 2006).

Comme nous l'avons déjà dit précédemment, les viscères d'animaux infectés laissés à la disposition des animaux sauvages par les chasseurs peuvent représenter un risque important pour les animaux charognards (Morris et al. 1994).

d. Risques liés aux facteurs paysagers, climatiques et pédologiques

La structure du paysage est un facteur qui influence le recouvrement des domaines vitaux des animaux sauvages et des bovins. La localisation des pâtures ou des bâtiments d'élevage en lisière de forêt augmente les risques d'interactions entre animaux sauvages et domestiques (Ward et al. 2010), l'interface pâture-forêt, représentée par les lisières, étant un écotone à risque pour l'émergence des agents pathogènes multi-hôtes (Boyard et al. 2008). La fragmentation du paysage (prés, champs, forêts, bosquets) augmente le dépôt d'urine par les blaireaux aux zones frontières entre deux milieux augmentant le risque de contamination de ces sites (White et al. 1993; Humblet et al. 2009). Les lisières sont très fréquentées par les sangliers et les blaireaux (Payne 2014) et constituent une zone privilégiée par les blaireaux pour établir leurs terriers et marquer leurs territoires par des mictions ou des latrines (Hutchings et al. 2002).

Comme nous l'avons vu précédemment, les conditions climatiques sont un facteur essentiel dans la durée de survie de *M. bovis* dans les différents substrats environnementaux contaminés et *in fine* dans la transmission indirecte de la maladie aux animaux qui interagissent avec ces substrats. Les saisons influencent également la fréquentation des pâtures par les animaux sauvages, avec un risque accru au printemps et en été vis-à-vis des blaireaux et des sangliers qui vermillent dans les pâtures, notamment lors des nuits humides où les vers de terre remontent en surface, appelées « nuits à lombrics » (Kruuk 1978; Cleary et al. 2011; Baubet et al. 2003). Lors de temps plus sec, voire de sécheresse, les points d'eau destinés aux bovins constituent des zones attractives pour la faune sauvage (Vicente et al. 2007; Santos, Santos, et al. 2015; Barasona et al. 2014), favorisant l'agrégation des animaux domestiques et sauvages.

Le rôle des facteurs pédologiques dans la survie de *M. bovis* est peu connu à ce jour. La texture du sol qui conditionne la structure, la porosité et le régime hydrique du sol, le pH et la matière organique disponible sont des facteurs importants dans la survie des bactéries. A notre connaissance, une seule étude statistique, réalisée dans le Michigan, a montré que la nature du sol, et plus précisément le pourcentage de sable, était associé à un risque d'infection plus élevé chez les bovins (Walter et al. 2014). Une augmentation d'1 % de la quantité de sable dans le sol augmentait de 3,6 % le risque pour des élevages bovins d'être infectés. Hormis cette étude qui relie indirectement infection animale et survie de la bactérie dans le sol, aucune étude n'est actuellement disponible sur le lien direct entre nature du sol et survie de *M. bovis*.

A la lumière des informations présentées dans ce chapitre, il apparaît, qu'une fois excrétée en dehors de son hôte, *M. bovis* peut survivre longtemps dans l'environnement si les conditions sont adéquates, par la mise en jeu de stratégies de survie encore inconnues à l'heure actuelle. Les connaissances sur les schémas de circulation de la bactérie entre les animaux infectés et l'environnement (et vice et versa) s'améliorent et permettent d'adapter les programmes de lutte contre la maladie, mais elles sont encore insuffisantes pour permettre la maîtrise de tous les facteurs en jeu. Ces différents facteurs sont schématisés dans la Figure 15.

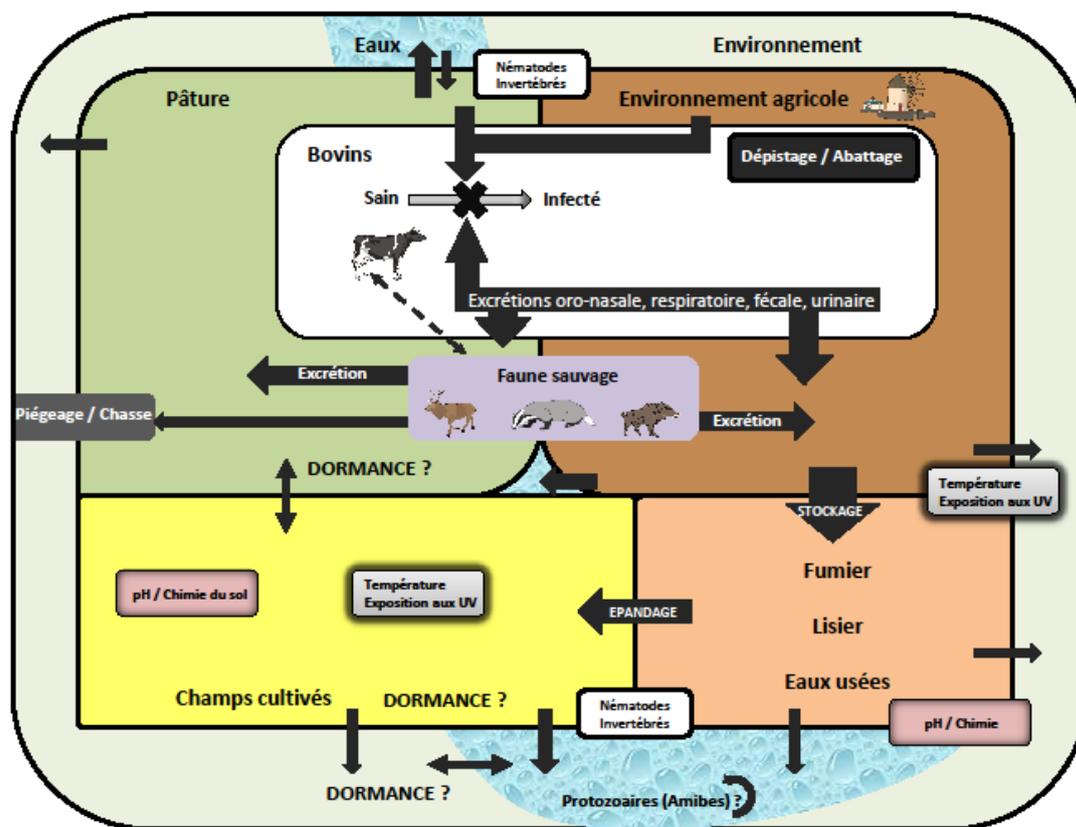


Figure 15 : Représentation schématique de la circulation de *M. bovis* dans l'environnement agricole (modifié d'après Elliott et al. 2014)

D. PRINCIPAUX OUTILS DE DETECTION, DE PHENOTYPAGE ET DE GENOTYPAGE APPLICABLES AU MTBC ET PLUS PARTICULIEREMENT A *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Depuis la découverte du bacille de la tuberculose, de nombreux outils ont été développés pour détecter et discriminer les différentes mycobactéries du MTBC. Ces méthodes microscopiques, phénotypiques et biochimiques, essentiellement développées pour le diagnostic médical, ont été peu à peu améliorées et associées à de nouvelles techniques de détection, de caractérisation et d'identification des bacilles telles que l'amplification génique et le séquençage notamment, améliorant la rapidité du diagnostic, la discrimination des espèces, la pertinence de l'antibiothérapie et permettant le génotypage des souches à des fins épidémiologiques. Adaptées à des échantillons biologiques divers, tels que les crachats, les liquides de lavage broncho-alvéolaire, les tissus de biopsies chez l'homme ou les broyats de nœuds lymphatiques chez les bovins et les animaux sauvages, ces outils ne sont pas tous applicables aux échantillons environnementaux hébergeant des communautés microbiennes très complexes.

1. La détection des mycobactéries par microscopie

La microscopie optique :

L'examen microscopique de frottis ou d'étalement d'échantillons biologiques est la première étape dans le diagnostic bactériologique de la tuberculose humaine. Elle est parfois la seule méthode de diagnostic dans les pays en voie de développement. Les propriétés tinctoriales particulières de la mycomembrane des mycobactéries sont exploitées dans les colorations utilisées. La coloration de référence est la coloration de Ziehl et Neelsen. Cette coloration à chaud est basée sur la résistance de la paroi des mycobactéries à la décoloration à l'acide et l'alcool après traitement à la fuschine. Les mycobactéries apparaissent comme des bâtonnets rouges sur un fond bleu. Des méthodes à froid basées sur les mêmes réactifs existent également (méthode de Kinyoun). La coloration à l'auramine, un fluorochrome, permet d'observer en microscopie à fluorescence les bacilles en vert-jaune brillant sur un fond jaune-orangé. Cette coloration est plus sensible que la coloration de ZN (Steingart et al. 2006).

Ces méthodes de coloration ne permettent pas de discriminer les mycobactéries entre elles et ne sont pas spécifiques du genre *Mycobacterium*, puisqu'elles peuvent colorer d'autres actinobactéries comme les genres bactériens *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Corynebacterium* (Shinnick & Good 1994). L'utilisation de la microscopie optique n'est pas décrite pour l'analyse des échantillons environnementaux, d'une part car le seuil de détection est élevé (de l'ordre de 10^4 BAAR/mL) et d'autre

part car la coloration est difficile à mettre en œuvre sur des matrices telles que du sol ou des matières fécales.

L'hybridation avec des sondes nucléotidiques : FISH (Fluorescence in situ hybridization).

Cette méthode est basée sur l'hybridation spécifique d'une sonde marquée avec un fluorochrome sur une région cible de l'ADN bactérien. Les sondes utilisées : ADN, ARNm ou oligonucléotides synthétiques (PNA : peptide nucleic acid), d'environ 20 bases, pénètrent à l'intérieur des cellules préalablement perméabilisées où elles s'hybrident spécifiquement avec leur ADN cible. L'observation se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

La méthode FISH a surtout été développée pour la détection des mycobactéries dans les crachats, dans des cultures liquides, chez des animaux infectés expérimentalement (Hongmanee et al. 2001; Stender, Mollerup, et al. 1999; Stender, Lund, et al. 1999) et dans des échantillons biologiques (Stender, Mollerup, et al. 1999; Lefmann et al. 2006; Rodriguez-Nuñez et al. 2012). La méthode FISH est peu utilisée pour la recherche de mycobactéries dans des échantillons environnementaux, mais elle a permis de mettre en évidence Maa et Map dans de l'eau et des biofilms de canalisations (Lehtola et al. 2006; Torvinen et al. 2007). Elle paraît toutefois difficilement applicable à des matrices telles que le sol à cause de l'auto-fluorescence générée par les particules de sol et du risque de non-spécificité des sondes.

2. Les méthodes de culture des mycobactéries

Le diagnostic de la tuberculose est indissociable de la culture car historiquement c'est la méthode la plus utilisée. Elle est sensible et permet d'isoler les souches, de les caractériser et de tester leur sensibilité aux antibiotiques. La recherche de mycobactéries par des méthodes basées sur la culture est très standardisée en diagnostic humain et vétérinaire, tout comme les traitements préliminaires indispensables. A l'opposé, aucune méthode standardisée n'est disponible pour la recherche de mycobactéries dans l'environnement. De nombreux protocoles empruntés à la microbiologie clinique ont été adaptés pour la recherche de mycobactéries environnementales, notamment dans l'eau (Narang et al. 2009; Radomski et al. 2011; Norby et al. 2007; Pickup et al. 2006; Whiley et al. 2012; Le Dantec et al. 2002; Bland et al. 2005). Les méthodes utilisées pour cultiver les mycobactéries pathogènes sont moins nombreuses et sont décrites ci-dessous.

a. Les différents traitements préalables à la mise en culture des échantillons

De nombreuses méthodes de décontamination des échantillons biologiques ont été décrites dans le diagnostic médical de la tuberculose. Le choix de la méthode à utiliser dépend essentiellement

du type d'échantillon analysé (tissu, crachat, lait, fèces, eau, sol...), des milieux de culture employés et de sa compatibilité avec les méthodes moléculaires. Les méthodes les plus utilisées en microbiologie humaine, méthodes de Petroff, Taquet-Tison et Kubica, utilisent la soude comme agent décontaminant principal (Petroff 1915; Taquet & Tison 1961; Kubica et al. 1963). L'utilisation d'acides comme agent décontaminant, tels que l'acide oxalique (David et al. 1989) ou l'acide sulfurique (Hohn & Lowenstein 1926), ou d'ammoniums quaternaires comme le chlorure de cétyle pyridinium (Smithwick et al. 1975) ou le chlorure de benzalkonium (Krasnow & Wayne 1966) est réservée aux échantillons très contaminés (urines, fèces) ou aux biopsies (cutanées, coliques, pulmonaires, etc.). Ces méthodes ne sont pas toutes compatibles avec la culture en milieu liquide et l'amplification génique.

Dans le domaine vétérinaire, les tissus animaux (broyats de ganglions, ou de tissus) sont décontaminés selon les préconisations de l'ANSES et suivent la norme AFNOR NF U47-104 basée sur l'utilisation de l'acide sulfurique et de la soude à 4%. Malgré la résistance des mycobactéries aux agents chimiques, la décontamination réduit fortement la population initiale présente dans l'échantillon et abaisse la sensibilité de la culture (Fine, Bolin, et al. 2011).

Concernant l'isolement de bactéries du MTBC dans les matrices environnementales ou les excréta animaux, les principales méthodes utilisées découlent des méthodes citées précédemment. La méthode d'immunocapture magnétique utilisée par Sweeney (2006 et 2007) a permis l'isolement de *M. bovis* dans des sols de terriers et des latrines contaminés naturellement. Cette méthode est basée sur l'utilisation de microbilles magnétiques recouvertes avec un ligand spécifique d'un antigène de l'enveloppe de *M. bovis*. Son avantage est qu'elle permet la capture et la concentration de la bactérie cible dans un échantillon complexe, sans altérer sa viabilité contrairement à la décontamination chimique. Cette méthode a également été testée avec succès sur des broyats de nœuds lymphatiques de bovins (Stewart et al. 2012; Stewart et al. 2013; Garbaccio & Cataldi 2010).

b. La culture sur milieu solide

Les milieux de culture solides à l'œuf (milieux de Löwenstein-Jensen et milieu de Coletsos) sont les plus utilisés en France dans le diagnostic bactériologique chez l'homme et l'animal. Ils sont sensibles et répondent aux exigences culturelles de la plupart des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses. Le milieu de Coletsos est particulièrement indiqué pour la culture des mycobactéries exigeantes telles que *M. bovis* et *M. africanum*.

Les milieux gélosés Middlebrook 7H10 et 7H11 sont des milieux semi-synthétiques non utilisés en diagnostic de routine en France, mais très utilisés aux Etats-Unis. Enrichis avec de l'OADC, mélange d'acide oléique, d'albumine bovine, de dextrose, de chlorure de sodium et de catalase, ils permettent une croissance plus rapide de *M. tuberculosis* (Mejia et al. 1999) et de *M. bovis* (Idigoras et al. 1995)

que les milieux à base d'œuf. L'ajout de sérum bovin et de sang de mouton lysé au milieu 7H11 enrichi en OADC améliore fortement la croissance de *M. bovis* à partir d'échantillons animaux et raccourcit le délai d'observation des colonies (Gallagher & Horwill 1977). Ce milieu a été utilisé pour la mise en culture d'échantillons environnementaux, tels que le sol ou les fèces après un traitement préalable de l'échantillon (Sweeney et al. 2006; Fine, O'Brien, et al. 2011), mais son manque de sélectivité nécessite l'ajout d'un cocktail d'antibiotiques, souvent composé de l'association d'une carboxypénicilline, de triméthoprime et de polymyxine B, et d'un antifongique (amphotéricine B) (Sweeney et al. 2007; Fine, O'Brien, et al. 2011). L'incubation des milieux solidesensemencés est réalisée à 37°C pendant au moins 8 semaines.

c. La culture en milieu liquide

Les milieux liquides ont été développés pour pallier la croissance lente des mycobactéries d'intérêt clinique sur les milieux solides, afin de confirmer précocement le diagnostic. Différents systèmes manuels ou automatisés existent à l'heure actuelle. Ils sont essentiellement utilisés dans le diagnostic chez l'homme, plus rarement chez l'animal.

Le système Bactec™ 460 (Becton Dickinson), basé sur la respirométrie radiométrique, n'est plus utilisé en France, mais il l'a été pendant une vingtaine d'années. Il était basé sur la mesure du dioxyde de carbone marqué au ¹⁴C rejeté par les mycobactéries en croissance dans un milieu contenant de l'acide palmitique marqué au ¹⁴C. La libération de ¹⁴CO₂ était mesurée régulièrement de façon manuelle grâce à un appareil adapté. La contrainte d'utilisation, de stockage et de recyclage de produits radioactifs ainsi que l'absence d'automatisation ont conduit à l'arrêt de sa commercialisation. Son utilisation a été décrite pour la détection de *M. bovis* sur des tissus animaux et des fèces (Corner et al. 2012; Thacker et al. 2015).

Pour éviter les inconvénients liés à la radioactivité, des méthodes non radiométriques ont été développées. La croissance bactérienne en milieu liquide est mise en évidence soit par la consommation de l'oxygène, soit par le dégagement de CO₂ dans le tube. La mise en évidence de la diminution de la pression partielle d'oxygène dissous dans le milieu de culture lors de la croissance bactérienne est utilisée dans les tubes BBL™ MGIT™ de Becton Dickinson. Lorsque l'O₂ diminue, les sels de ruthénium présents au fond du tube émettent une fluorescence. L'utilisation de systèmes automatisés tels que les systèmes Bactec™ MGIT™ assurent une lecture en continue de la fluorescence émise. Le système Bactec™ MGIT™ a été utilisée pour la recherche de *M. bovis* dans des broyats de nœuds lymphatiques de bovins (Hines et al. 2006; Stewart et al. 2013), des tissus d'animaux sauvages (Murphy et al. 2010; Witmer et al. 2010) et dans du fromage frais (Harris et al. 2007). L'augmentation du CO₂ dans le milieu de culture lors de la croissance bactérienne est à la base du système Bact/ALERT

3D de Biomérieux. Cette méthode colorimétrique est basée sur la diminution du pH suite à la libération du CO₂. L'automate évalue en continu le virage de couleur d'une pastille fixée au fond du tube. Les systèmes décrits permettent également la recherche de résistance à différents antibiotiques (Piersimoni et al. 2006). A notre connaissance, cette technique n'a jamais été utilisée pour la culture d'échantillons environnementaux.

Ces différents systèmes utilisent comme milieu liquide le Middlebrook 7H9, supplémenté en OADC ou en ADC (Albumine bovine, dextrose, catalase) pour améliorer la croissance des mycobactéries et rendu plus sélectif par l'ajout d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques pour éviter la croissance de bactéries indésirables. Le plus utilisé est le PANTA™ (polymyxine B, amphotéricine, acide nalidixique, triméthoprime, azlocilline). Il peut être complété avec de la vancomycine (effet contre les bactéries gram +). L'avantage majeur de ces systèmes en milieu liquide est la diminution du délai moyen de détection des mycobactéries. Avec le système Bactec™, *M. tuberculosis* est détectée entre 8 et 30 jours en fonction de la charge bactérienne initiale de l'échantillon. La détection de *M. bovis* est réalisée en 15 jours contre environ 45 jours sur milieu solide. Lorsque la culture est déclarée positive, la présence de BAAR doit être vérifiée par coloration, sub-culture sur milieu de Löwenstein-Jensen, identification biochimique ou moléculaire. L'association de la culture en milieu liquide et solide donne les meilleurs résultats avec une limite de détection de 10 à 10² bacilles/mL d'échantillon (Guillet-Caruba et al. 2014).

NB : A la fin du 19^{ème} siècle et au début du 20^{ème}, la discrimination des espèces *M. bovis*, *M. tuberculosis* et *M. avium* se faisait principalement par inoculation de l'isolat bactérien au cobaye, au lapin et au poulet. Des lésions pulmonaires, hépatiques et spléniques importantes chez le cobaye et le lapin identifiaient *M. bovis*, des lésions retrouvées uniquement chez le cobaye ou le poulet identifiaient respectivement *M. tuberculosis* et *M. avium* (Kazda et al. 2009). Cette méthode était utilisée pour l'identification de *M. bovis* dans les tissus animaux et les échantillons environnementaux comme le sol et l'eau après décontamination avec un mélange de javel et de soude (Maddock 1933; Maddock 1934; Maddock 1936; Williams & Hoy 1930).

3. Méthodes de détection et d'identification des bactéries du MTBC

Pour des raisons épidémiologiques, sanitaires (isolement du malade pour éviter la transmission) et thérapeutiques (mise en place d'une antibiothérapie adéquate), il est primordial de différencier les membres du MTBC des autres mycobactéries et d'identifier précisément l'espèce du MTBC en cause.

a. Caractérisation phénotypique et biochimique des mycobactéries du MTBC

Depuis la découverte du bacille de la tuberculose jusqu'au développement des outils modernes, les différentes espèces de mycobactéries ont été identifiées grâce à leurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques. Certaines de ces caractéristiques sont encore exploitées à l'heure actuelle en complément des méthodes de biologie moléculaire plus rapides. L'aspect des colonies sur un milieu solide, leur délai d'apparition, leur nombre, leur aspect rugueux ou lisse et la présence d'une pigmentation ou non permet d'orienter l'identification vers une mycobactérie du MTBC ou une NTM. Dans le MTBC par exemple, *M. tuberculosis* apparaît en 20 jours sur milieu à l'œuf sous forme de colonies ivoire en chou-fleur d'aspect rugueux. Les colonies de *M. bovis* apparaissent tardivement (6 à 10 semaines), elles sont non pigmentées, petites, fines et lisses (Carbonnelle et al. 2003). Les principaux tests biochimiques utilisés pour différencier les différentes espèces du MTBC sont le test à la niacine, la réduction des nitrates, l'hydrolyse du Tween, la sensibilité au TCH (acide thiophène-2-carboxylique), à la cyclosérine et au pyrazinamide. Les résultats des observations phénotypiques et biochimiques permettant de différencier les principales espèces du MTBC sont présentés dans le Tableau 2. Les tests biochimiques nécessitent des cultures riches et ne sont donc pas réalisables avant la croissance avancée de la bactérie. Chronophages et fastidieux, ces tests sont remplacés par d'autres techniques plus rapides.

Tableau 2: Identification des principales mycobactéries du MTBC par des observations phénotypiques et des tests biochimiques

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Aspect des colonies	Rugueuses	Rugueuses	Lisses	Rugueuses
Pigmentation	Non pigmenté	Non pigmenté	Non pigmenté	Non pigmenté
Croissance	Lente	Lente	Lente	Lente
Niacin test	+	-	-	-
Réduction nitrates	+	+/-	-	-
TCH	R	S	S	S
Cyclosérine	S	S	R	R
Pyrazinamide	S	S	R	R

+ : test positif, - : test négatif, R : résistant, S : sensible

b. L'identification des mycobactéries par recherche de biomarqueurs

Différentes techniques de recherche de biomarqueurs potentiels de *M. tuberculosis* par chromatographie ont été développées récemment. La chromatographie en phase liquide (HPLC : High-

Performance Liquid Chromatography) a été développée pour l'analyse des acides mycoliques (Butler & Guthertz 2001). La chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS) est utilisée pour identifier des acides gras spécifiques de la paroi de *M. tuberculosis* comme l'acide tuberculostéarique ou l'acide hexacosanoïque dans des crachats (Cha et al. 2009; Kaal et al. 2009). L'identification de biomarqueurs spécifiques permet de différencier *M. tuberculosis* des NTM en GC-MS en diagnostic direct sur des crachats (Dang et al. 2013).

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) est utilisée pour l'identification rapide des mycobactéries du complexe *tuberculosis* et de la majorité des autres mycobactéries à partir de cultures en milieu solide et liquide (El Khéchine et al. 2011; Bille et al. 2012; Lotz et al. 2010; Biswas & Rolain 2013). Cette technique permet d'établir un spectre de masse des différentes protéines constituant la mycobactérie (profil peptidique obtenu après digestion trypsique des protéines totales). La comparaison du profil protéique obtenu avec des bases de données internationales de plus en plus étoffées permet d'identifier un grand nombre d'espèces de mycobactéries. Elle peut être également utilisée comme méthode de spoligotypage (Shitikov et al. 2012). Cette méthode est simple, rapide, reproductible et nécessite des consommables peu coûteux (hors achat et entretien de l'appareil). La qualité du profil protéique obtenu est toutefois fortement dépendante de la qualité du protocole d'extraction des protéines (Saleeb et al. 2011). La technique MALDI-TOF est probablement une technique d'avenir pour l'identification rapide des mycobactéries à croissance lente (le délai de croissance reste toutefois le facteur limitant) et plus généralement des microorganismes pathogènes d'intérêt clinique dans les échantillons. A l'heure actuelle, elle ne permet pas de différencier les différentes espèces du MTBC. Elle n'est pour l'instant applicable qu'à des isolats bactériens issus de culture et non à des échantillons complexes.

- c. L'identification des mycobactéries par des méthodes d'hybridation couplées ou non à la PCR

La technique basée sur l'hybridation de l'ADN est une méthode sensible, rapide et simple d'emploi couramment utilisée en bactériologie humaine. Elle est réalisée sur une culture liquide ou solide. La technique est basée sur l'hybridation d'une sonde moléculaire conjuguée à un marqueur chimioluminescent complémentaire de l'ARN ribosomal de la bactérie cible. Le kit commercial AccuProbe (Gen Probe) fournit différentes sondes permettant d'identifier les Complexes *tuberculosis*, *avium*, *gordanae*, *kansaii* (sans discrimination des espèces), ainsi que les espèces *M. avium* et *M. intracellulare*.

Le système le plus utilisé à l'heure actuelle est le GenXpert MTB/RIF (Cepheid), utilisant la PCR

en temps réel multi-colorimétrique. Il utilise 5 sondes Beacon (sondes avec une structure en épingle à cheveux qui fluorescent lors de l'hybridation) spécifiques du locus *rpoB* (région de 81 pb déterminant la résistance à la rifampicine) des membres du MTBC. L'intérêt de cette technique est à la fois pratique, puisque l'opérateur dépose l'échantillon décontaminé dans une cassette contenant tous les réactifs lyophilisés, l'appareil gère toutes les autres étapes, et diagnostique, car elle couple la détection des bactéries du MTBC et la mise en évidence d'une éventuelle résistance à la rifampicine, antituberculeux de première ligne chez l'homme.

D'autres systèmes, tels que l'INNO-Lipa® Mycobacteria v2 (Fujirebio), le GenoType MTBC et le GenoType *Mycobacterium* CM/AS (Hain Lifescience), sont basés sur l'hybridation d'une sonde, spécifique d'un Complexe ou d'une espèce, sur la région intergénique variable 16S-23S après amplification PCR. Ils permettent d'identifier les Complexes *tuberculosis* et *avium* ainsi que de 16 à 40 espèces de NTM.

Ces techniques sont essentiellement utilisées dans le diagnostic humain, mais elles sont parfois décrites pour l'identification du Complexes *tuberculosis* en diagnostic animal (Oloya et al. 2007; Pavlik et al. 2005; Bollo et al. 1998; Liébana et al. 1995). Bien que déjà utilisées sur des échantillons environnementaux comme l'eau (Aronson et al. 1999), elles sont à utiliser avec précaution car des erreurs d'identification ont été rapportées (croisement entre des mycobactéries saprophytes et pathogènes) (Turenne 2004), en outre, elles ne permettent pas la discrimination des différentes espèces du MTBC.

d. Le séquençage

L'outil génotypique de référence pour l'identification des différentes espèces de bactéries est le séquençage du gène codant l'ARN de la sous-unité 16S du ribosome (gène *rrs*). De nombreux couples d'amorces ont été proposés dans la littérature pour amplifier entièrement ou partiellement le gène *rrs* avant séquençage mais l'identification des mycobactéries par cette méthode n'est pas toujours possible à cause de la forte conservation de cette séquence. Afin d'améliorer la discrimination de ces espèces, le séquençage total ou partiel d'autres gènes cibles a été développé, tels les gènes de ménage ciblant *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (Adékambi & Drancourt 2004; Lee et al. 2000), *hsp65* codant une protéine de réponse au stress thermique de 65 kDa (McNabb et al. 2004; Ringuet et al. 1999; Teleni et al. 1993), *gyrA* et *gyrB* codant les sous-unités α et β de l'ADN gyrase (enzyme intervenant dans l'enroulement et le déroulement de l'hélice d'ADN), *recA* intervenant dans la recombinaison homologue de l'ADN et dans sa réparation (Blackwood et al. 2000), *sodA* codant la super oxyde dismutase (Zolg & Philippi-Schulz 1994), *secA1* codant la protéine SecA1 intervenant dans la sécrétion des protéines à travers la membrane plasmique (Zelazny et al. 2005) ou la région inter-

génique encadrée par les ARNr 16S et 23S (appelée ITS: Internal Transcribed Spacer) (Roth et al. 1998). Malgré une amélioration de la discrimination par l'analyse combinée de ces différentes cibles, le séquençage ne permet pas d'identifier toutes les différentes bactéries du MTBC. A cause de la forte conservation des séquences dans le MTBC, le séquençage d'un grand nombre de gènes est nécessaire pour discriminer les espèces (Kirschner et al. 1993; Böddinghaus et al. 1990), ce qui n'est pas réalisable en routine.

Depuis l'identification de la plupart des gènes et des mutations responsables de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux, le séquençage est un des moyens utilisé pour identifier les souches résistantes. La résistance à la rifampicine par exemple est liée à plusieurs mutations sur le gène *rpoB* modifiant la structure de la sous-unité β de l'ARN polymérase et empêchant la fixation de la rifampicine sur l'ARN polymérase conduisant à son inefficacité (Zhang & Yew 2009). Ces mutations peuvent être détectées par séquençage du gène amplifié par PCR.

e. Détection et génotypage des mycobactéries du MTBC : les marqueurs utilisés

(1) Les séquences d'insertion

Les séquences d'insertion (IS) correspondent à de petits éléments génétiques transposables. Elles contiennent uniquement les informations génétiques nécessaires à leur transposition dans le génome de la bactérie (transposase). On dénombre 42 IS dans le premier génome annoté de *M. bovis* AF2122/97 (Garnier et al. 2003). La séquence d'insertion IS6110, spécifique du MTBC, est la cible historique utilisée pour la détection moléculaire du Complexe *tuberculosis* en PCR (Thierry, Cave, et al. 1990; Thierry, Brisson-Noël, et al. 1990; Dziadek et al. 2001). La méthode de référence pour le génotypage de *M. tuberculosis* est la RFLP-IS6110 (Restriction Fragment Length Polymorphism sur l'IS6110). C'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, Cave, et al. 1990; Thierry, Brisson-Noël, et al. 1990). Elle jouerait un rôle dans l'adaptation des bactéries du MTBC à leur hôte et dans leur virulence (Otal et al. 2008; Safi et al. 2004).

De nombreux systèmes d'amorces ont été développés pour la détection de l'IS6110 par PCR dans les échantillons biologiques (Dziadek et al. 2001; El Khéchine et al. 2009; Liébana et al. 1996; Savelkoul et al. 2006). Différents kits commerciaux utilisés à l'heure actuelle sont basés sur la détection de l'IS6110, notamment dans le diagnostic animal (Courcou et al. 2014). Cette cible a déjà été utilisée pour la détection de *M. bovis* dans des échantillons inoculés en PCR nichée (Adams et al. 2013) ainsi que pour la détection moléculaire du MTBC dans du sol, de l'eau, des sédiments et des matières fécales d'animaux (Santos, Santos, et al. 2015) (Tableau 3).

L'IS6110 est également utilisée pour le typage des bactéries du MTBC. La comparaison des souches repose sur le nombre d'IS6110 et leurs positions sur le chromosome après extraction de l'ADN, digestion par une endonucléase (*PvuII* qui coupe l'IS6110 sur un seul site), électrophorèse, transfert sur membrane et hybridation (Van Soolingen et al. 1991). Chaque fragment contenant une copie de l'IS6110 produit une bande (Figure 16). Cette méthode standardisée bénéficie de banques de données de profils d'hybridation internationales qui permettent des investigations épidémiologiques. Cette méthode est beaucoup moins discriminante sur les souches à faible nombre d'IS (Allix et al. 2006), comme *M. bovis* qui n'en contient qu'une à cinq copies et *M. bovis* BCG qui n'en contient qu'une seule copie (Van Soolingen et al. 1991; Skuce et al. 1994). Le résultat est obtenu en une dizaine de jours, nécessite un volume important de culture et des manipulations fastidieuses. De ce fait, il a été remplacé par des méthodes plus rapides indépendantes de la culture : le spoligotypage et le typage MLVA.

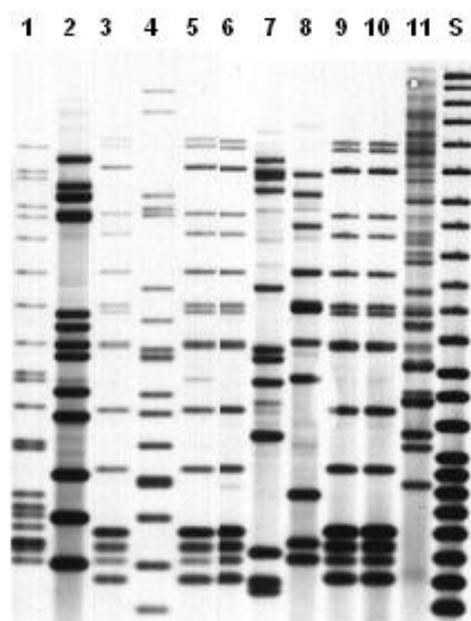


Figure 16: Profils de restriction d'isolats de *M. tuberculosis* obtenus suite à une RFLP-IS6110. Les isolats 3, 5, 6, 9 et 10 ont le même profil et possédaient un lien épidémiologique. S représente le marqueur de poids moléculaire. (Source web: site CDC).

(2) Les courtes séquences d'ADN répétées

Le locus DR :

Les souches du Complexe *tuberculosis* contiennent une région chromosomique particulière, unique et figée, caractérisée par des séquences répétées de 36 pb, appelée locus DR (Direct Repeat) qui appartient à la famille des ADN répétitifs CRISPR (Clustered Regularly Interspersed Short

Palindromic Repeats). Ces DR sont séparés par des espaceurs de 35 à 41 pb dont les séquences sont uniques et polymorphes. Ce polymorphisme, associé à la délétion de certains espaceurs par des réarrangements génétiques est exploité dans le spoligotypage (en anglais, spoligotyping : SPacer OLIGOnucléotide TYPING) (Kamerbeek et al. 1997). 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) comme présenté dans la Figure 17. Le génotypage par spoligotypage est basé sur l'amplification par PCR du locus DR, le marquage des amplicons et leur hybridation par des oligonucléotides fixés à une membrane (spoligotypage 2D). Le profil final est détecté par chimioluminescence (Kamerbeek et al. 1997). Dans la technologie Luminex, les oligonucléotides sont fixés sur des microbilles à signature spectrale différente (spoligotypage 3D) (Zhang et al. 2010). Le spoligotypage standard analyse 43 espaceurs et permet d'obtenir des données épidémiologiques et phylogénétiques déterminantes (Sola et al. 2001). Il est largement utilisé pour typer les souches de *M. bovis*, notamment en France (Haddad et al. 2001). Cette méthode est réalisable sur de faibles quantités d'ADN, même impur, et des bactéries non cultivables. C'est une technique robuste, rapide, simple de réalisation dont le résultat est facile à interpréter car il fournit un code binaire (pour chaque espaceur présent : 1 ou absent : 0) faisant l'objet d'une convention internationale (Dale et al. 2001). Toutefois, 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.

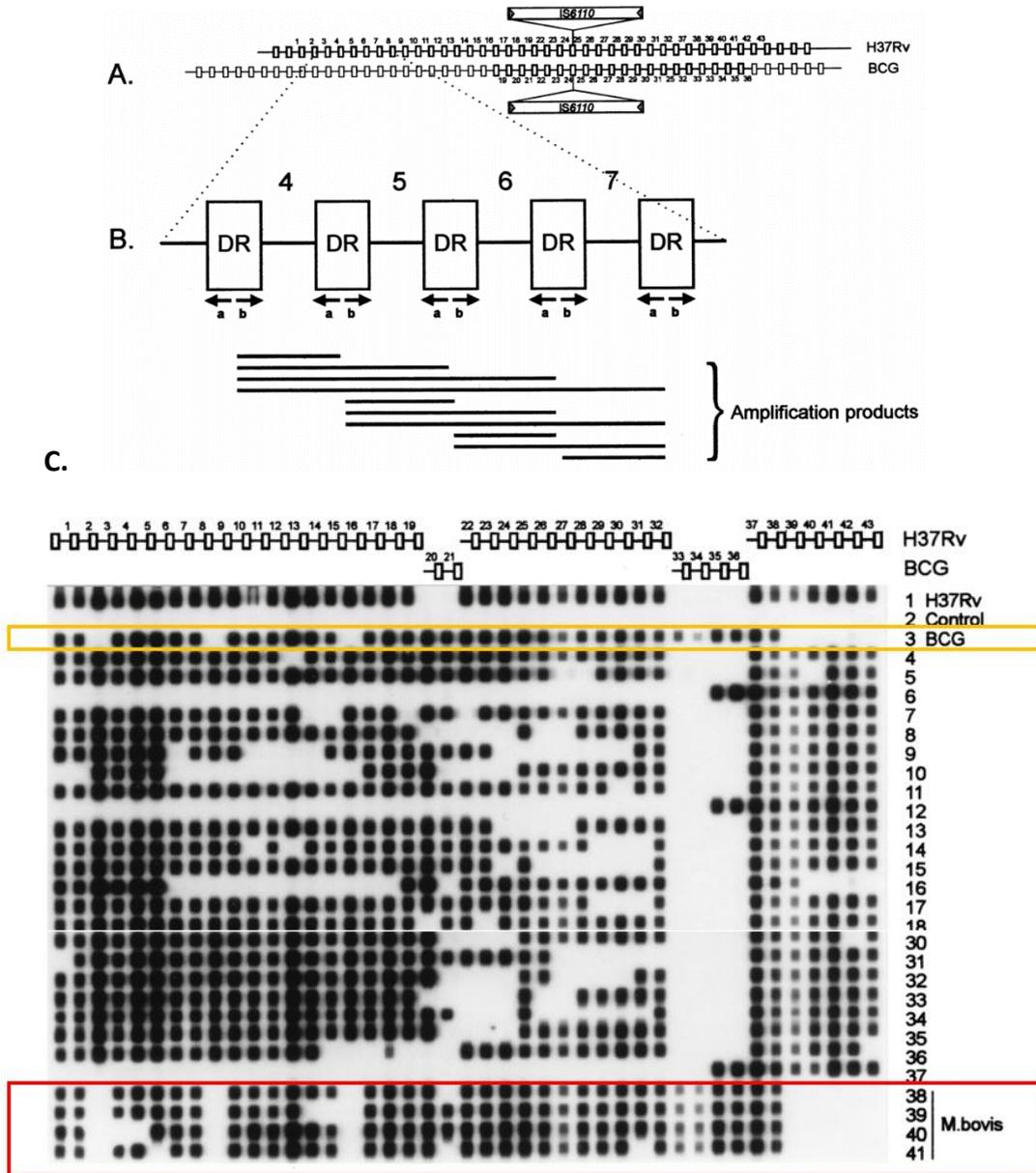


Figure 17: Principe du spoligotypage des bactéries du MTBC d'après Kamerbeek et al (1997). A: Représentation du locus DR de *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* BCG. B : Amplifications des espaces par un couple d'amorces (a et b) et amplicons obtenus. C : Profils d'hybridation sur membrane (un carré noir signale la présence de l'espaceur, les parties blanches leur absence)

Tableau 3 : Cibles moléculaires décrites dans la littérature pour la détection du Complexe *tuberculosis* ou de *M. bovis* dans les échantillons environnementaux

Gène ou locus cible	Espèces cibles	PCR	Taille du produit PCR (pb)	Limites de détection (bactéries. g ⁻¹ sol ou .mL ⁻¹)	Matrices analysées	Quantification si détection positive (nb gènes ou UFC. g ⁻¹ sol ou .mL ⁻¹)	Référence	Utilisé par
<i>mpb64</i>	MTBC	PCR classique	543	10 ¹ -10 ²	Sols (terriers et prés adjacents)	1,0 - 2,5 × 10 ³	(Gormley 1999)	(Young et al. 2005)
<i>mpb70</i>	MTBC	PCR classique	471	10 ¹ -10 ²	Sols (terriers et prés adjacents)	1,0 - 2,5 × 10 ³	(Gormley 1999)	(Young et al. 2005) (Courtenay et al. 2006)
Gène codant l'ARNr 16S	Mycobactéries à croissance lente	RT-PCR	605	10 ² -10 ³	Sols (terriers et prés adjacents)	-	(Young et al. 2005)	(Young et al. 2005) (Courtenay et al. 2006)
<i>IS6110</i>	MTBC	PCR nichée	PCR1 : 252 PCR2 : 116	-	Sol, Eau Foin, Maïs	-	(Adams et al. 2013)	(Adams et al. 2013)
<i>IS6110</i>	MTBC	PCR nichée	110	Sol : 4,0 × 10 ⁴ Eau : 5,0 × 10 ⁵	Sol Sédiment Eau et fèces		(Soo et al. 2006)	(Santos, Santos, et al. 2015)
RD12	<i>M. bovis</i> <i>M. caprae</i>	PCR classique	306	Sol : 1,0 × 10 ⁶ Eau : 5,0 × 10 ⁵	Sol Sédiment Eau et fèces		(Warren et al. 2006)	(Santos, Santos, et al. 2015)
RD12	<i>M. microti</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. pinnipedii</i>	PCR semi-nichée	369	Sol : 4,0 × 10 ⁴ Eau : 5,0 × 10 ⁵	Sol Sédiment Eau et fèces		(Warren et al. 2006)	(Santos, Santos, et al. 2015)
RD4 (zone flanquante)	<i>M. bovis</i>	qPCR	142	4,2 × 10 ⁵ (Pontiroli et al. 2011) 1,0 × 10 ⁵ (Pontiroli et al. 2011)	Sols de terriers Latrines	6,8 × 10 ⁴ à 5,4 × 10 ⁶ (Sweeney et al. 2007) 2,0 × 10 ⁴ à 1,0 × 10 ⁸ (Travis et al. 2011)	(Sweeney et al. 2007)	(Sweeney et al. 2007) (King, Murphy, James, Travis, Porter, Sawyer, et al. 2015) (King, Murphy, James, Travis, Porter, Hung, et al. 2015) (Pontiroli et al. 2011) (Roug et al. 2014)
Rv1510 (RD4)	MTBC sauf <i>M. bovis</i>	PCR classique	1 033	-	Sols de terriers Latrines	-	(Huard et al. 2003)	(Courtenay et al. 2006) (Sweeney et al. 2006) (Sweeney et al. 2007)

Les mini-satellites :

Les mini-satellites correspondent à de courtes séquences d'ADN répétées (de 10 à 1 000 pb) et consécutives. 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 répétées en tandem dont le nombre et la séquence sont variables (notamment les VNTR : Variable Number Tandem Repeat et les ETR : Exact Tandem Repeat) (Supply et al. 2001; Supply et al. 2006). 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 le MIRU-VNTR peut porter sur 12, 15 ou 24 loci pour le typage des souches de *M. tuberculosis* selon l'objectif envisagé (épidémiologie ou phylogénie) (Supply et al. 2001; Supply et al. 2006). Concernant le typage des souches animales de *M. bovis*, différentes combinaisons de marqueurs VNTR ont été évaluées (Roring et al. 2002; Allix et al. 2006; Skuce et al. 2002; Boniotti et al. 2009) et ont montré que l'analyse de 5 à 8 loci suffisait pour obtenir un pouvoir de discrimination supérieur à 90%. En France, 8 loci ont été sélectionnés sur leur polymorphisme et leur pouvoir de discrimination et utilisés pour typer plus de mille isolats cliniques recueillis entre 1978 et 2011 (Hauer et al. 2015). Dans cette étude, les résultats de génotypage se présentent sous forme d'un code à 8 chiffres (Tableau 4). Pour un même spoligotype SB0120, le génotypage MIRU-VNTR permet de différencier les souches retrouvées en Côte d'Or de celles de Dordogne. Ces résultats ont également permis de démontrer l'homogénéité des profils génétiques retrouvés chez les animaux domestiques et sauvages dans une zone géographique, confirmant l'hypothèse de la transmission interspécifique de l'infection.

Tableau 4: Spoligotypes et génotypes MIRU-VNTR des souches de *M. bovis* isolées chez les bovins et la faune sauvage en Côte d'Or et en Dordogne (d'après Hauer et al. 2015)

Spoligotype	Génotype MIRU-VNTR (8 loci ciblés)								Origine des isolats
	2165	2461	0577	580	2163a	2163b	4052	3232	
SB0120 Côte d'Or	5	5	4	3	11	4	5	6	Bovins, blaireaux, sangliers
SB0120 Dordogne	5	3	5	3	9	4	5	6	Bovins, blaireaux, sangliers
SB0134 Côte d'Or	6	4	5	3	6	4	3	6	Bovins, blaireaux, sangliers, cerfs

La combinaison du spoligotypage et de la MLVA optimise la discrimination des souches pour les suivis épidémiologiques et apporte des informations phylogénétiques intéressantes. Elle permet également de suivre l'émergence de variants clonaux chez un animal ou dans un troupeau infecté en fonction du temps (Navarro et al. 2015; Rodriguez-Campos et al. 2014). Toutefois les loci à analyser doivent être adaptés en fonction des complexes clonaux rencontrés dans la région ou le pays étudiés (Boniotti et al. 2009; Hauer et al. 2015). 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 (regroupe les spoligotypes des espèces déléetées pour RD9) (Couvin & Rastogi 2014; Smith & Upton 2012).

(3) Régions de Différence (RD) et Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Les Régions de Différences (RD1 à RD14) identifiées chez les bactéries du MTBC correspondent à des délétions et des réarrangements génétiques irréversibles et discriminants. Ces RD sont spécifiques d'une espèce ou communes à plusieurs espèces. Le plus grand nombre de RD est observé dans le génome de *M. bovis* BCG qui présente 14 RD par comparaison à *M. tuberculosis* H37Rv (Gordon et al. 1999; Brosch et al. 2002). En parallèle, six séquences déléetées chez *M. tuberculosis* H37Rv (les RvD) et une séquence absente de toutes les souches de *M. tuberculosis* (TbD1) sont présentes chez les autres bactéries du MTBC (Gordon et al. 1999; Brosch et al. 2002). L'absence de RD4 est spécifique à *M. bovis* et *M. bovis* BCG et permet de les différencier des autres membres du MTBC (Huard et al. 2003; Huard et al. 2006). La RD4 a été utilisée dans différentes études pour la détection de *M. bovis* dans les échantillons environnementaux (Courtenay et al. 2006; Sweeney et al. 2007; King, Murphy, James, Travis, Porter, Sawyer, et al. 2015; Travis et al. 2011; Roug et al. 2014; Pontiroli et al. 2011). Dans une étude récente, Santos *et al.* (2015) ont associé la détection du MTBC par l'IS6110 à une identification de l'espèce par amplification de deux régions de la RD12 pour différencier *M. bovis*/*M. caprae* des autres espèces du Complexe (Tableau 3).

L'intérêt des RD est bien plus phylogénétique que génotypique, puisque l'étude de leur apparition successive au cours de l'évolution a permis d'établir précisément la phylogénie des différentes espèces comme présenté précédemment dans la Figure 3 (Huard et al. 2006; Rodriguez-Campos et al. 2014; Dippenaar et al. 2015).

Les Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) correspondent à des mutations ponctuelles d'une base dans un génome. Ils 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 utile pour la caractérisation de la variabilité d'un groupe clonal et l'étude des relations phylogénétiques entre les souches (Mathema et al. 2006).

f. Identification par séquençage complet des génomes

Le séquençage complet des génomes (WGS : Whole Genome Sequencing) bénéficie depuis quelques années de nouvelles technologies (NGS : Next Generation Sequencing) plus rapides et moins coûteuses que la méthode de Sanger. Différentes technologies coexistent à l'heure actuelle, dont les plus utilisées sont le pyroséquençage 454 (toutefois en fin d'utilisation), la technique Illumina et la technique Ion PGM (Ion Personal Genome Machine) (Desikan & Narayanan 2015). Ces techniques ont révolutionné le génotypage en fournissant le plus haut niveau de discrimination génétique possible. Ces techniques, parfois couplées au typage des SNPs, permettent de suivre la dynamique de transmission d'une maladie, de caractériser l'antibiorésistance d'une souche et d'évaluer la divergence génétique de souches qui ont les mêmes profils de restriction ou de génotypage (Schürch & 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). Une étude récente portant sur le séquençage complet de 82 souches de *M. bovis* isolées en France entre 1978 et 2011 a permis de démontrer la congruence entre le typage par spoligotypage/MIRU-VNTR et le typage des souches par analyse des SNP (Hauer, 2015), suggérant que certains SNP pourraient être utilisés comme cibles dans le génotypage de *M. bovis*. Dans un futur proche, le WGS 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 animaux (Biek et al. 2012; Pepperell et al. 2013; Rodriguez-Campos et al. 2014).

Les puces (microarrays) à ADN ou ARN sont utilisées pour la comparaison de génomes complets des espèces du MTBC et ont notamment apporté des informations sur l'expression de gènes de la 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; Smith et al. 2011). Ces techniques appartiennent toutefois au domaine de la recherche et ne sont pas utilisées en routine.

g. Méthode spécifique d'identification des mycobactéries animales utilisée par le Laboratoire National de référence de la tuberculose bovine : LNR TB

L'identification des mycobactéries isolées sur des animaux est réalisée au LNR TB de Maisons-

Alfort. En première intention, quatre systèmes de détection moléculaires ciblant des séquences d'insertion (*IS6110*, *IS1081*, *IS1245*) et le gène *atpE* sont utilisés en qPCR pour orienter l'identification (Tableau 5).

Tableau 5 : Systèmes de détection utilisés en qPCR en première intention pour l'identification d'une mycobactérie d'origine animale et résultats obtenus. + : amplification de la cible, - : absence d'amplification de la cible.

	ARNr 16S	IS1245	IS901	IS6110	IS1081	IS1561'	RD4	RD7	<i>atpE</i>
Complexe <i>tuberculosis</i>									
<i>M. bovis</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>M. microti</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>M. caprae</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Complexe <i>avium</i>	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+
Autres mycobactéries	+	-	-	-	-	-	-	+	+
		(Slana et al. 2010)	(Slana et al. 2010)	(Courcoul et al. 2014)		(cette thèse)			(Radomski et al. 2013)

L'identification des espèces du complexe *tuberculosis* (*IS6110* et *IS1081* positives) est ensuite réalisée par génotypage grâce à la technique de spoligotypage (Zhang et al. 2010). L'amplification ou non des *IS1245* et *IS901* permet d'identifier les espèces : Mah (*IS1245* et *IS901* négatives), Maa (*IS1245* et *IS901* positives) et Mah (*IS1245* positive et *IS901* négative) (Slana et al. 2010). L'identification des autres mycobactéries repose sur le séquençage de l'*hsp65* puis de la comparaison par BLAST avec une base de données (Telenti et al. 1993) .

De par le grand nombre d'espèces de mycobactéries et la forte identité des espèces dans le Complexe MTBC, la détection et le génotypage des souches du MTBC reposent obligatoirement sur l'utilisation conjointe de différentes techniques. En fonction des échantillons disponibles et des objectifs souhaités, qu'ils soient diagnostiques, épidémiologiques ou phylogénétiques, le choix des techniques à utiliser doit être réfléchi et pertinent.

Objectifs de la Thèse :

Depuis 2004, la situation de la Côte d'Or vis-à-vis de la tuberculose bovine est préoccupante. Malgré la mise en place de moyens de surveillance et de lutte en premier lieu dans les cheptels bovins puis dans la faune sauvage, l'éradication de la maladie semble difficile. Depuis 2011, on observe une diminution du nombre des foyers bovins et une stabilité du nombre de cas observés dans la faune sauvage, avec une concentration spatiale des foyers dans des petites vallées. Dans ces vallées où cohabitent faune sauvage et bovins, la transmission indirecte du bacille entre animaux sauvages et domestiques par le biais de l'environnement est fortement suspectée pour plusieurs cas bovins. Bien que plusieurs études aient démontré la présence de *M. bovis* dans différentes matrices environnementales naturelles sur les lieux de vie d'animaux domestiques et sauvages infectés, notamment en Angleterre et en Espagne, aucune donnée n'est disponible sur la contamination environnementale potentielle par *M. bovis* dans les zones endémiques de tuberculose bovine en France, et plus particulièrement en Côte d'Or.

Pour répondre à cette question, le premier objectif du travail de thèse a été de développer et de valider sur des échantillons inoculés artificiellement des outils moléculaires spécifiques et sensibles pour la détection des souches du MTBC et de *M. bovis* dans les substrats environnementaux naturellement contaminés, tels que le sol, l'eau et les sédiments et les matières fécales animales. Nous avons également développé un protocole d'extraction-décontamination des mycobactéries du sol couplé à une technique originale de suivi de croissance des mycobactéries en milieu liquide dans l'objectif d'isoler les souches environnementales de *M. bovis* (Chapitre 2).

Les outils moléculaires développés ont été utilisés pour la recherche de *M. bovis* dans un grand nombre d'échantillons environnementaux (sol, eau, sédiments, fèces animales et membres de la micro- ou méso-faune des sols) prélevés dans la zone endémique de Côte d'Or, et plus précisément dans des zones partagées par la faune domestique et sauvage infectée, afin de préciser le niveau de contamination des lieux de vie des bovins et des animaux sauvages (Chapitre 3).

Face aux études parfois controversées sur le rôle des facteurs abiotiques dans la persistance de *M. bovis* dans le sol, nous avons recherché l'effet de la nature du sol et de la température sur la durée de survie de *M. bovis* SB0120 en conditions de laboratoire (Chapitre 4).

Nous avons enfin étudié le rôle de la faune du sol et plus particulièrement des lombrics, très abondants dans les pâtures et gros consommateurs de matière organique, dans la circulation et la dissémination de *M. bovis* dans les sols (Chapitre 5).

CHAPITRE 2

Développement et optimisation d'outils pour la détection de *Mycobacterium bovis* dans les échantillons environnementaux

PARTIE CONFIDENTIELLE à l'exception des méthodes de détection moléculaire

CHAPITRE 2 - Développement et optimisation d'outils pour la détection de *Mycobacterium bovis* dans les échantillons environnementaux

A. DEVELOPPEMENT D'OUTILS MOLECULAIRES ADAPTES AUX MATRICES ENVIRONNEMENTALES

Les différents systèmes moléculaires utilisés pour la détection de *M. bovis* dans l'environnement cités dans la littérature sont synthétisés dans le Tableau 3. En considérant la diversité et l'abondance des mycobactéries potentiellement présentes dans l'environnement, nous avons éliminé les systèmes ciblant toutes les espèces du MTBC, notamment l'IS6110, car bien que très sensible et spécifique sur les échantillons biologiques et très utilisée en diagnostic humain et vétérinaire, nous avons montré qu'elle n'était pas utilisable en diagnostic environnemental. En effet, nous avons effectué des essais préliminaires avec le kit LSI VetMAX™ *Mycobacterium tuberculosis* PCR Kit (Life Technologies) utilisé en diagnostic vétérinaire sur 25 échantillons de sol provenant de zones géographiques non impactées par la tuberculose bovine. Pour tous ces sols, l'IS6110 a donné un signal moléculaire quantifiable, témoignant de l'absence de spécificité de ce système pour la matrice sol.

De plus, *M. microti*, membre du MTBC, agent de la tuberculose des petits rongeurs, est susceptible d'être retrouvé dans le sol (Courtenay et al. 2006) et a déjà été isolé sur des félins et des animaux sauvages en Côte d'Or (Laprie et al. 2013; Michelet et al. 2015). Nous avons donc développé des systèmes moléculaires qui n'amplifient pas *M. microti*.

Enfin, *M. bovis* est une mycobactérie pathogène de classe III qui nécessite une manipulation dans un laboratoire de confinement L3. Pour des raisons techniques et pour s'affranchir de la contrainte de confinement dans la mise au point de la technique de PCR, nous avons utilisé une des souches atténuées de *M. bovis*, et plus précisément *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, manipulable dans un laboratoire de type L2 disponible à l'INRA de Dijon. Nous avons donc choisi des cibles moléculaires également présentes chez *M. bovis* BCG.

Pour augmenter la spécificité de la détection moléculaire dans les matrices environnementales complexes, nous avons choisi d'utiliser la PCR quantitative avec une sonde TaqMan®, qui est formée par un nucléotide lié de façon covalente à un fluorophore (reporter) en 5' et à un désactivateur (quencher) en 3'. Le clivage de la sonde par la Taq polymérase après l'hybridation à la séquence d'ADN complémentaire éloigne le quencher du fluorophore qui émet une fluorescence mesurée en temps réel dans un thermocycleur adapté.

Le système moléculaire décrit précédemment par Sweeney *et al.* (2007) ciblant les marges de la région RD4 délétée uniquement chez *M. bovis* et *M. bovis* BCG nous a particulièrement intéressés. Des amorces internes à la séquence RD4 ont été utilisées en PCR pour la discrimination de *M. bovis* avec les autres membres du MTBC (pas de signal pour *M. bovis* mais un signal pour les autres membres du MTBC) (Huard *et al.* 2003; Courtenay *et al.* 2006). Des amorces de PCR classique ont également été dessinées sur les zones flanquantes de la région RD4 (Brosch *et al.* 2002). Ces amorces ont été adaptées à la technologie TaqMan[®] avec une amorce et une forward localisées sur les marges de la séquence délétée et une sonde à cheval sur la zone de délétion (Sweeney *et al.* 2007). La spécificité et la validation de ce système sur différents échantillons environnementaux, tels que des sols de terriers, des fèces de blaireaux et de buffles africains ont été démontrées dans plusieurs études (Sweeney *et al.* 2007; Roug *et al.* 2014; Travis *et al.* 2011; Pontiroli *et al.* 2013; King *et al.* 2015). Ce système de détection nous paraissant *a priori* spécifique pour la discrimination de *M. bovis* dans le MTBC et adapté aux matrices complexes, nous l'avons inclus dans l'étude. Toutefois, l'amorce Reverse du système de détection a été modifiée par nos soins afin de réduire l'amplicon obtenu de 146 à 116 bases, taille plus adaptée à la technologie TaqMan[®].

Face au manque de systèmes discriminants disponibles dans la littérature, nous avons dessiné deux nouveaux systèmes. Nous avons choisi de cibler la séquence d'insertion IS1561' (Rv3349c) car elle est présente chez tous les membres du MTBC sauf *M. microti* (Gordon *et al.* 1999; Huard *et al.* 2003; Brodin *et al.* 2002). Elle appartient à la famille des ISL3, qui regroupe des copies d'IS défectueuses chez *M. tuberculosis*, elles sont alors annotées avec une apostrophe.

La troisième cible a été choisie dans une région chromosomique de *M. tuberculosis* appelée RD1, présente chez les souches virulentes de *M. tuberculosis* et *M. bovis*, mais partiellement délétée chez *M. bovis* BCG (Mahairas *et al.* 1996) et *M. microti* (Brodin *et al.* 2002). Cette région contient notamment un cluster de 6 gènes (Rv3871 à Rv3876) qui fait partie des gènes codant les protéines antigéniques ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target 6kD) et CFP-10 (Culture Filtrat Protein 10kD), responsables de la réponse immunitaire de l'hôte. *M. bovis* BCG et *M. microti* sont les deux seuls membres du MTBC à présenter une délétion de ce cluster, délétion probablement en partie responsable de leur absence de virulence et de leur utilisation en vaccination (Pym *et al.* 2002). Chez *M. bovis* BCG, la région aval de ce cluster est délétée : la région délétée est appelée RD1^{bcg} (Figure 18). Chez *M. microti*, c'est la région amont du cluster qui est absente : la région délétée est appelée RD1^{mic}. Nous avons plus particulièrement ciblé le locus Rv3866, présent chez *M. tuberculosis* et dans toutes les souches de *M. bovis* et *M. bovis* BCG mais absente chez *M. microti* (Brodin *et al.* 2002), *M. avium* et *M. smegmatis* (Mahairas *et al.* 1996).

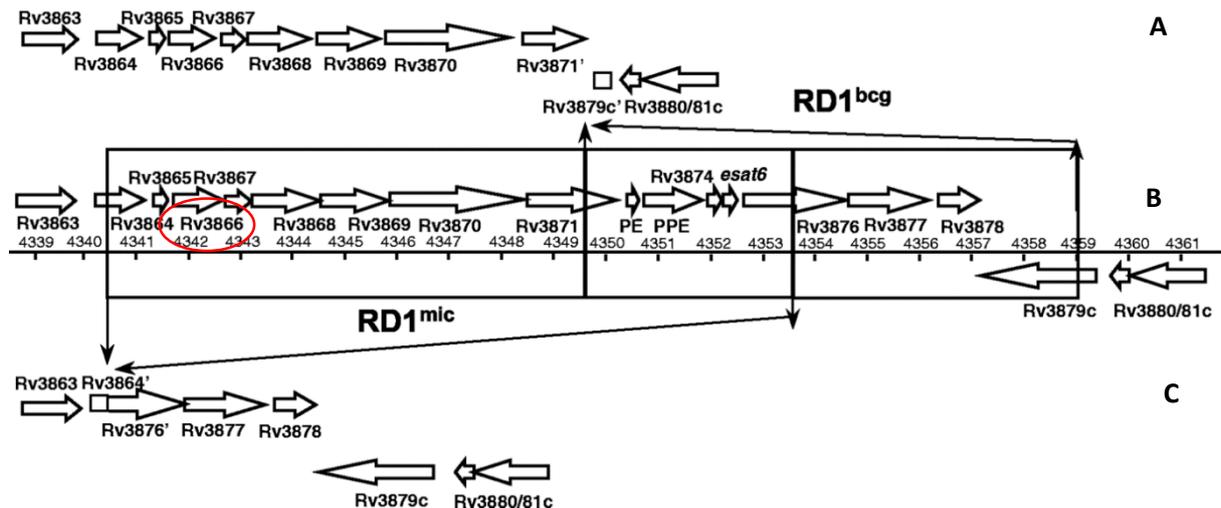


Figure 18 : Différences génomiques de la région RD1 entre *M. bovis* BCG (A), *M. microti* (C) par comparaison à *M. tuberculosis* H37Rv (B) d'après Brodin et al. 2002 et localisation du locus Rv3866. RD1^{mic} correspond à la séquence de *M. tuberculosis* déléetée chez *M. microti*. RD1^{bcg} correspond à la séquence de *M. tuberculosis* déléetée chez *M. bovis* BCG.

Les séquences d'intérêt ont été recherchées pour les membres du MTBC et certaines MNT sur la base de données GenBank. Un alignement de ces séquences a été réalisé grâce au portail d'analyses bioinformatiques MOBYLE @PASTEUR pour rechercher les régions conservées et les régions de différence. Le dessin des oligonucléotides a été réalisé grâce au logiciel en ligne Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Les systèmes de détection ont été testés *in silico* grâce à l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) afin d'évaluer la spécificité de nos systèmes pour chaque cible par rapport à une base de données de génomes séquencés.

La validation (spécificité et seuil de détection) de ces trois systèmes, ainsi que leur utilisation dans le screening d'un nombre important d'échantillons environnementaux sont présentées dans le Chapitre 3 dans l'article intitulé « First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis ». Les résultats des analyses réalisées en 2013 sont présentés dans un article publié en 2014 dans la revue de l'AEEMA (association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies animales) en Annexe 1.

CHAPITRE 3

Etude de la prévalence environnementale de *Mycobacterium bovis* dans la zone endémique de tuberculose bovine de Côte d'Or et résultats obtenus en Charente

Elodie Barbier, Maria Laura Boschioli, Eric Gueneau, Murielle Rochelet, Ariane Payne, Krystel de Cruz, AnneLaure Blieux, Céline Fossot, Alain Hartmann.

First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis

(Article accepté, en cours de publication, Journal of Applied Microbiology)

CHAPITRE 3 - Etude de la prévalence environnementale de *Mycobacterium bovis* dans la zone endémique de tuberculose bovine de Côte d'Or et résultats obtenus en Charente

A. AVANT-PROPOS

Dans la synthèse bibliographique présentée dans le chapitre 1, nous avons décrit la situation épidémiologique complexe de la tuberculose bovine en Côte d'Or. Dans ce département, *Mycobacterium bovis* circule dans un système multi-hôtes complexe, incluant les bovins, les blaireaux, les cervidés et les sangliers, sur une zone géographique limitée (Payne, 2014). La faune sauvage infectée et potentiellement excrétrice est suspectée d'être à l'origine de la contamination ou recontamination de certains foyers bovins dans cette zone (ANSES, 2011; Courcou, Moutou, & Vialard, 2013). Le mode de transmission indirecte est suspecté car les contacts directs entre bovins et animaux sauvages sont rarement décrits (Drewe, O'Connor, Weber, McDonald, & Delahay, 2013; Kukielka et al., 2013). Ce mode de transmission repose sur la contamination de matrices environnementales par des mycobactéries viables et virulentes à la faveur de l'excrétion animale, puis sur l'interaction d'animaux avec ces matrices. Démontrée par des méthodes moléculaires et/ou culturales en Angleterre et en Espagne sur des sites partagés par les espèces sauvages et les bovins (King et al., 2015; Santos et al., 2015; Sweeney et al., 2006, 2007), la contamination environnementale par *M. bovis* n'a pas encore fait l'objet d'études dans les zones endémiques françaises.

Afin d'évaluer la prévalence et l'existence de réservoirs potentiels de *M. bovis* dans l'environnement des bovins et des animaux sauvages infectés en Côte d'Or, nous avons développé et validé des systèmes de détection moléculaire, ou modifié des systèmes existants, adaptés aux matrices environnementales complexes pour détecter les espèces du MTBC et plus spécifiquement *M. bovis*. Ces systèmes ont été utilisés pour analyser plus de 400 échantillons environnementaux (sol, eau, sédiments, microfaune, fèces) prélevés en Côte d'Or. Notre stratégie d'échantillonnage a ciblé des pâtures suspectes, sur lesquelles des bovins infectés ont transité, et autour desquelles des animaux sauvages infectés ont été détectés et plus particulièrement les zones pouvant être partagées par les différentes espèces, notamment les zones d'abreuvement. Nous avons également analysé des échantillons provenant de sites fréquentés exclusivement par la faune sauvage, notamment des sols de terriers et des latrines de blaireaux localisés à proximité du site de piégeage de blaireaux infectés, ainsi que des sédiments prélevés dans les trous d'eau ou souilles fréquentés par les sangliers et cervidés.

B. FIRST MOLECULAR DETECTION OF *MYCOBACTERIUM BOVIS* IN ENVIRONMENTAL SAMPLES FROM A FRENCH REGION WITH ENDEMIC BOVINE TUBERCULOSIS

E. Barbier^{1,2}, M.L. Boschioli³, E. Gueneau⁴, M. Rochelet², A. Payne¹, Krystel de Cruz³, A.L. Blieux⁵, C. Fossot⁶, A. Hartmann¹

1 INRA, UMR 1347 Agroécologie, Dijon Cedex, France

2 Université de Bourgogne Franche Comté, UMR 1347 Agroécologie, Dijon Cedex, France

3 Université Paris-Est, Laboratoire National de Référence de la Tuberculose, Unité de Zoonoses Bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, Maisons-Alfort Cedex, France

4 Laboratoire Départemental de la Côte d'Or, Dijon, France

5 Welience, SATT Grand-Est, AgrOnov, Bretenière, France

6 Phytocontrol Paris, M.I.N. de Rungis, Rungis Cedex, France

Running head

Environmental detection of *Mycobacterium bovis*

Corresponding author

Alain Hartmann, UMR 1347 Agroécologie, INRA, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon, Cedex, France. E-mail : alain.hartmann@dijon.inra.fr

ABSTRACT**Aims**

The aim of the study was to determine the prevalence of *Mycobacterium bovis* (the causative agent of bovine tuberculosis, bTB) in environmental matrices within a French region (Côte d'Or) affected by this zoonotic disease.

Methods and Results

We report here the development and the use of molecular detection assays based on qPCR (double fluorescent dye labelled probe) to monitor the occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) or *M. bovis* in environmental samples collected in pastures where infected cattle and wildlife had been reported. Three qPCR assays targeting members of the MTBC (IS1561' and Rv3866 loci) or *M. bovis* (RD4 locus) were developed or refined from existing assays. These tools were validated using *M. bovis* spiked soil, water, and feces samples. Environmental samples were detected positive for the presence of MTBC strains and *M. bovis* in the environment of bTB-infected farms in the Côte d'Or region.

Conclusions

The development of molecular assays permitted testing of several types of environmental samples including spring water, sediment samples and soils from badger setts entrance located in the vicinity of these farms, which were repeatedly contaminated with *M. bovis* (up to 8.7×10^3 gene copies per g of badger sett soil). For the first time, direct spoligotyping of soil DNA enabled identification of *M. bovis* genotypes from environmental matrices.

Significance and Impact of the Study

All together, these results suggest that *M. bovis* occurs at low levels in environmental matrices in Côte d'Or within the bTB-infected area. Drinking contaminated water or inhaling contaminated bioaerosols might explain cattle infection in some cases.

Keywords

Mycobacterium bovis; environment; quantitative real-time PCR; indirect transmission

INTRODUCTION

Bovine tuberculosis (bTB) is a worldwide spread zoonosis, caused by *Mycobacterium bovis*, a pathogenic mycobacteria that belongs to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). This disease affects cattle that are the natural host of *M. bovis* but also a wide range of domestic or wild mammals, including humans (Morris *et al.* 1994; Biet *et al.* 2005). Infected wildlife can act as a bTB reservoir, maintaining and spreading *M. bovis* infection in cattle. Many studies including French ones, showed the circulation of the bacteria within multi-host systems including cattle and various wild species as badgers (*Meles meles*), wild boar (*Sus scrofa*) or red deer (*Cervus elaphus*) (Little *et al.* 1982; Aranaz *et al.* 2004; Gortázar *et al.* 2008; Zanella *et al.* 2008; Richomme *et al.* 2010; Payne *et al.* 2012). The zoonotic nature of bTB may represent a public health threat. Moreover animal disease leads to important economic losses mainly due to cattle testing, slaughtering campaigns and wildlife screening trials.

Infected animals can excrete *M. bovis* via sputum, feces, urine and any type of aerosols (Little *et al.* 1982; Phillips *et al.* 2003; Palmer *et al.* 2004; Payne 2014) and thus contaminate their environment (Phillips *et al.* 2003). This may contribute to contamination of cattle pastures through deposition of *M. bovis* on cattle feedstuffs and into drinking water. Indeed, many studies confirmed the presence and the persistence of *M. bovis* in environmental substrates such as soil, feces, hay, corn, water (Young *et al.* 2005; Courtenay *et al.* 2006; Sweeney *et al.* 2006; Fine *et al.* 2011; Ghodbane *et al.* 2014), despite many technical difficulties in isolating this organism from environmental substrates. Altogether these data strongly suggest that the environment may constitute a reservoir of *M. bovis* from which cattle might get infected. However there is still very little direct evidence concerning these potential *M. bovis* environmental reservoirs and the way that animals might get infected through them.

The European Commission declared that France was bTB-free in 2001. However the disease is still a persistent problem in several regions including Côte d'Or (Middle East of France, Figure 1). Despite a very low national prevalence in cattle (0.075 % since 2012), complete eradication of the disease seems difficult to achieve (Fediaevsky *et al.* 2014). In Côte d'Or, *M. bovis* circulates in a multi-host system including badgers, wild boar and deer within a restricted area of the region (Payne 2014; Hauer *et al.* 2015). As shown in Figure 1, two genotypes are found in this area: *M. bovis* spoligotype SB0120 VNTR profile 5 5 4 3 11 4 5 6 in the northern bTB endemic area and *M. bovis* spoligotype SB0134 VNTR profile 6 4 5 3 6 4 3 6 in the southern area. Between 2002 and 2014, 196 cattle breakdowns have been registered in Côte d'Or (Cote d'Or Regional Veterinary Service, personal communication). Wild animals in the vicinity of infected cattle herds were found to be infected by *M. bovis* with the same genotypes (Hauer *et al.* 2015).

Direct cross contamination between cattle has historically been considered as the main

transmission route of *M. bovis* (Morris *et al.* 1994; Phillips *et al.* 2003), but environmental contamination is suspected in many herd infections when cattle and wildlife share the same resources (Garnett *et al.* 2002; Palmer *et al.* 2004). However, this hypothesis has never been extensively explored in France. This is probably due to the lack of adequate detection tools to monitor *M. bovis* under natural environmental conditions. Indeed, most of the studies report the detection of *M. bovis* from experimentally inoculated environmental samples (Fine *et al.* 2011; Adams *et al.* 2013). Although the culture method is the gold standard for direct diagnosis of *M. bovis* in animals, it is not well suited to studying environmental samples due to the abundance of soil microbial communities and the slow growth rate of *M. bovis*. To circumvent these drawbacks, the use of highly selective media containing antibiotics and antifungals in combination with sample decontamination is required in order to prevent competition of fast growing organisms. However such pretreatments strongly reduce *M. bovis* viability (Thornton *et al.* 1998; Fine 2006). On the other hand, molecular detection tools such as semi-quantitative PCR have been used to detect *M. bovis* in soils, water and badger feces. Following DNA extraction, detection of MTBC members or *M. bovis* was done using primers targeting *mpb64*, *mpb70*, *hsp65*, 16SrRNA genes, or IS6110 insertion sequence (Young *et al.* 2005; Courtenay *et al.* 2006; Sweeney *et al.* 2006; Adams *et al.* 2013; Santos *et al.* 2015). More recently, a *M. bovis* specific qPCR (based on double fluorescent dye probe detection) was developed to target the RD4 deletion flanking sequences (Sweeney *et al.* 2007). This molecular system has been validated in several studies to test environmental substrates such as soil, badger feces and cow slurry (Pontiroli *et al.* 2011; Travis *et al.* 2011; King *et al.* 2015a; King *et al.* 2015b). This RD4 based qPCR assay allowed to detect the occurrence of *M. bovis* within environmental matrices in UK (Sweeney *et al.* 2007; King *et al.* 2015a; King *et al.* 2015b). Finally, Santos *et al.* (Santos *et al.* 2015) successfully used a hemi-nested PCR targeting the RD12 locus, which is common to *M. bovis* and *M. caprae*, to monitor these species in environmental substrates from bTB endemic regions located in the Iberian Peninsula.

In this context, the objectives of this study were, firstly to develop new sensitive qPCR based tools and to refine an existing one (based on RD4 deletion sequence) for the specific detection of MTBC or *M. bovis* in environmental matrices. The sensitivity and specificity of qPCR based detection systems were evaluated on a collection of mycobacterial strain DNAs but also on DNAs extracted from samples (soil, water and feces) spiked with known amounts of *M. bovis*. Secondly, we aimed to screen large numbers of environmental samples (soil, sediments, water, feces) originating from both bTB endemic or bTB free areas to assess the presence of MTBC and more specifically the presence of *M. bovis* in these areas.

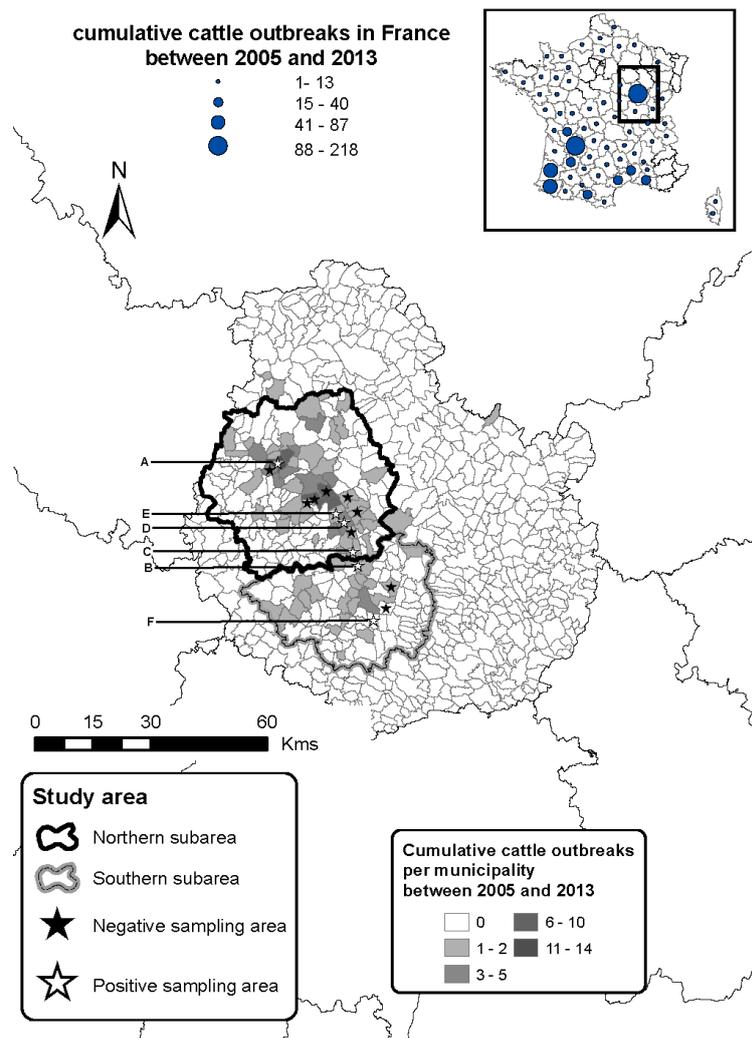


Figure 1: Distribution of bTB cumulative outbreaks in cattle in France (picture in the insert above) and per municipality in Côte d'Or from 2005 to 2013. Geographical location of the sampled areas are indicated by black stars and the location of the six positive areas are indicated by white stars and named A, B, C, D, E and F respectively.

MATERIALS AND METHODS:

Bacterial strains:

A collection of bacterial strains belonging to the species *M. bovis*, *M. bovis* BCG vaccine strain and other mycobacterial species (Table 1) was used to test the specificity of the primers to detect *M. bovis*. Crude thermo-lysates of strains corresponding to: 20 bacterial spoligotypes of the *M. bovis* species, 4 other species of the MTBC, 2 sub-species of the *Mycobacterium avium* Complex (MAC) and 20 non tuberculous mycobacteria (NTM). Field strains belong to the National Reference Laboratory collection and were previously identified by several genotyping methods using four qPCR assays done in parallel and targeting IS6110, IS1081, IS1245 and *atpE*. Namely, MTBC members are positive for

IS6110 and IS1081 targets (Courcoul *et al.* 2014), MAC members are positive for the IS1245 target (Slana *et al.* 2010) and finally NTM are positive for the *atpE* target (Radomski *et al.* 2013). Furthermore, spoligotyping was used to discriminate the different MTBC species (Zhang *et al.* 2010). IS901 was used to discriminate between MAC members (Slana *et al.* 2010) and *hsp65* sequencing was used to discriminate between other mycobacteria species (Telenti *et al.* 1993). Attenuated *M. bovis* BCG strain Pasteur 1173P2 was used as target organism to validate the specificity and detection limits of the qPCR assay in soil, water and feces microcosms.

Origin of environmental samples:

Within the bTB endemic zone in Côte d'Or, a total number of 356 environmental samples were collected from 15 areas (an area corresponds to a municipality territory including at least one bTB infected cattle farm) between April 2013 and December 2014. In those areas, typical landscape is observed *i.e.* limestone plateau with forest or farm fields overhang small hills. The hillslopes are covered with hydromorphic soils containing marl and clay/limestone. Alluvial valleys set at the bottom of the slopes. Cattle usually graze on those pastures during summer and spring. Samples of soil, sediment and water were collected in areas frequented by both wildlife and cattle such as feeding areas, waterholes, naturally occurring springs, drinking troughs, with open access to livestock and wildlife. Knowing that bTB infected badgers were discovered in the vicinity of the pastures grazed by infected cattle, (Cote d'Or Regional Veterinary Service, personal communication), soils from badger setts and latrines were also collected.

Twenty-four agricultural soils were randomly chosen as control soils in French bTB-free areas among a panel of soils from the French soil quality monitoring network (Réseau de Mesures de la Qualité des Sols, Infosol, INRA Orléans). Among them, 11 french soils were collected from Brittany (North West of France), Yvelines (Middle north of France), Haut Rhin (North east of France), while 13 soils were collected in the bTB-free area of Côte d'Or.

In order to evaluate the detection limit of the qPCR assay, we used two agricultural soils from two bTB-free areas of Côte d'Or (Soil S1 and soil S2), one pond water and badger feces from animals tested as bTB-free from non-infected areas. Both soils were sampled in a bTB-free cattle pasture in November 2013. They were chosen for their contrasted structural and physico-chemical properties (Table 2).

DNA extraction and purification:

DNAs from all soil, sediment and latrine samples were extracted from 2 g-samples as following. Briefly, 8 ml of lysis buffer (0.1 mol l⁻¹ Tris pH 8.0, 0.1 mol l⁻¹ EDTA pH 8.0, 0.1 mol l⁻¹ NaCl and 2 % (w/v) SDS), 4 g of silica beads (100 µm diameter), 5 g of ceramic beads (1.4 mm diameter) and 8 glass beads (4 mm diameter) were added to each sample placed in a 15 ml conical centrifugation tube (Falcon,

Dominique Dutscher, France). Samples were disrupted for 3×30 s at 4 m s^{-1} in a FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals Europe, France), incubated for 30 min at 70°C and centrifuged for 5 min at 7000 g at room temperature in a Sigma 3-18K centrifuge (Sigma-Aldrich, Germany). Supernatants were incubated on ice for 10 min with 1/10 volume of 3 mol l^{-1} potassium acetate pH 5.5 and then centrifuged for 5 min at 14000 g . One volume of ice-cold isopropanol was added to the supernatant for DNA precipitation overnight at -20°C . DNA was collected by centrifugation (30 min at 14000 g , 4°C), and DNA pellets were washed with ice-cold ethanol (70 %) and dissolved in $100 \mu\text{l}$ of water. Crude DNA extracts ($100 \mu\text{l}$) were loaded on a Microbiospin column (Biorad, France) filled with 100 mg of polyvinyl polypyrrolidone (Sigma Chemical Co, France). After centrifugation (4 min at 1000 g , 4°C), eluted DNA was further purified using the GeneClean Turbo Kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. For water samples, the microbial biomass was concentrated by filtering from 100 ml to a maximum of 1 l of water sample (depending on water turbidity) through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore HAWP filter (47 mm, Merk Millipore, Germany). Filters were then ground in liquid nitrogen and DNA was extracted as described above. Nematodes were extracted from soil using an Oostenbrink elutriator (Oostenbrink 1960). DNA extraction was achieved as described above.

Purified DNA concentrations were estimated using a NanoDrop[®] 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, France) at 260 nm wavelength.

Choice of gene targets, design of primers and probes for qPCR assays:

A first qPCR detection system assay targeting the insertion sequence *IS1561'* was designed. This insertion sequence is present in all the MTBC members except in *M. microti* (Huard *et al.* 2003; Huard *et al.* 2006). The primers and double dye probe sequences are given in Table 3. *IS1561'* contains a defective transposase and belongs to the ISL3 family (Gordon *et al.* 1999). In order to confirm the specificity of the detection for MTBC, a nested PCR protocol was additionally developed: the first step was a classical PCR using primers targeting a sequence of 222-bp sequence in the *IS1561'* surrounding the 76-bp qPCR product (Table 3); the second step was a qPCR assay targeting the 76-bp fragment. To confirm the results obtained with *IS1561'* qPCR assay, two supplementary qPCR targets were used. The first one was the Rv3866 locus located in the RD1 locus (Brodin *et al.* 2002). The second one was the RD4 flanking region (the RD4 locus is specifically deleted in *M. bovis*). To improve the qPCR efficiency, the RD4 based assay was derived from a previously reported qPCR assay (Sweeney *et al.* 2007) by modifying the reverse primer to reduce the size of the qPCR product from 142 to 116 bp (Table 3). The RD4 based qPCR assay designed by Sweeney *et al.* (Sweeney *et al.* 2007) has previously been validated for environmental matrices in several studies (Pontiroli *et al.* 2011; Travis *et al.* 2011; King *et al.* 2015a; King *et al.* 2015b). Primers and probe were designed from alignments of mycobacterial genes from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) such as *M. bovis* AF2127/97, four strains of *M. bovis*

BCG, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. africanum* GM041182 and *Mycobacterium canettii* CIPT 140010059 (respective accession numbers: NC_002945.3, NC_008769.1, NC_016804.1, NC_012207.1, GCA_000463215.1, NC_000962.3, NC_015758.1, NC_015848.1) using Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>) The specificity of the assay was tested *in silico* by BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Primers and probes were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium).

Quantitative real time PCR (qPCR) and nested PCR conditions:

For the three qPCR assays, reactions were carried out in a 25 µl reaction mix containing 12.5 µl of Absolute QPCR ROX Mix (Thermo Scientific, France) at a final concentration of 1X, 1 µl of T4 bacteriophage gene 32 product (final concentration 25 ng µl⁻¹, MP Biomedicals Europe, France), 1 µl of each primer (final concentration 400 nmol l⁻¹), 0.5 µl of each probe (final concentration 200 nmol l⁻¹), 4 µl of ultrapure water and 5 µl of diluted DNAs for the environmental samples screening. Absolute quantification was achieved using standard DNA dilutions. A recombinant plasmid containing one copy of the IS1561' fragment of *M. bovis* BCG str. Pasteur 1173P2 cloned in the pCR®II-TOPO® vector (Invitrogen, France) was used as a standard. A calibration curve was obtained by amplification of serial dilutions of the plasmid ranging from 1 to 10⁶ copies per PCR reaction. All the environmental metagenomic DNA samples were screened with the IS1561' based qPCR assay and final results were expressed as the gene copy number per g of soil, feces or water. qPCR assays were performed in a VIIA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, France). Initial denaturation was made at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles with denaturation at 95°C for 15 s and annealing and elongation at 60°C for 1 min.

Positive DNA extracts were then tested by the nested IS1561' PCR protocol as follows: the first PCR was achieved in a 25 µl reaction mixture containing 17.25 µl of ultrapure water for molecular biology, 2.5 µl of PCR Buffer 10X with MgCl₂, 0.2 µl of dNTP mix at 25 mmol l⁻¹ each, 0.05 µl of Taq DNA polymerase 15 U µl⁻¹ (Taq Core Kit 25, MP Biomedicals Europe, France), 1.25 µl of each primers (final concentration 500 nmol l⁻¹) and 2.5 µl of environmental DNA. The nested PCR was achieved in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, France) with a first step of denaturation at 94°C for 5 min, then 30 cycles for 30 s at 94°C for denaturation, 30 s at 60°C for annealing and 30 s at 72°C for elongation, and 5 min at 72°C for final elongation. The qPCR was then achieved in the same conditions as described above using as a target a 5 µl aliquot of a 100-fold dilution of the first PCR product.

Preliminary screening of all environmental samples was done using the IS1561' based qPCR assay targeting MTBC species. The IS1561' positive samples were then further analysed using the Rv3866 based qPCR to confirm the presence of MTBC and the RD4 based qPCR assay to confirm the presence of *M. bovis*. All qPCR assays were done in triplicate.

Determination of qPCR assays analytical sensitivity in spiked soil, feces or water microcosms:

Microcosms consisting of 2 g of fresh soil S1 and S2 sieved to 4 mm, 2 g of fresh badger feces or 100 mL of pond water were spiked in triplicate with 100 μ L of 10-fold serially diluted suspensions of *M. bovis* BCG strain Pasteur, to reach *M. bovis* concentrations ranging from 2.5 to 2.5×10^6 CFU per gram of soil or feces and 5.0 to 5.0×10^6 CFU per 100 mL of water. Briefly, inoculum suspensions were realized as following: a thirty days *M. bovis* BCG liquid culture was vortexed for 15 s with glass beads (4 mm diameter) in order to disrupt aggregates. Optical bacterial density was then measured at 600 nm (Biophotometre, Eppendorf, France) to roughly estimate mycobacterial concentration. Appropriate 10-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) were prepared in sterile water. *M. bovis* concentration was estimated by spreading in triplicate 100 μ L-aliquot of 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} diluted suspension onto Middlebrook 7H11 agar enriched with OADC 10 % (Sigma-Aldrich, France). Plates were incubated at 37°C for two months and then *M. bovis* colonies were counted. Results were reported as CFU per ml of suspension.

The spiked microcosms were incubated at room temperature for 3-4 hours prior to DNA extraction as described in the section 3. To assess the reproducibility, all qPCR assays were done in triplicate and performed as previously, using the three detection systems targeting IS1561', Rv3866 and RD4. Non-inoculated soil, feces or water used to prepare the microcosms proved to be negative with the three qPCR systems in preliminary experiments.

Estimation of DNA quality for PCR amplification:

Efficiency of qPCR might be impaired by the presence of PCR inhibitors in DNA extracts. The quality of DNA extracted from soil, water and feces was assessed by measuring the capacity to amplify a control DNA target in the presence of various dilutions of soil DNA extracts. Briefly, qPCR reactions were done in a final volume of 25 μ L containing 2.5 μ L of 10^6 copies of the circularized pGEM-T Easy plasmid DNA and 5 μ L of water (control) or diluted soil DNA (5-, 10-, 20-fold dilutions), 1X Absolute qPCR SYBR Green ROX Mix (final concentration 500 nmol l⁻¹, Thermo Scientific, France), 25 ng μ L⁻¹ of T4 bacteriophage gene 32 product. qPCR primers were SP6 (5' - ATTTAGGTGACACTATAG - 3') and T7 (5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3') universal primers (final concentration 500 nmol l⁻¹) targeting the polylinker of the plasmid. qPCR and cycling conditions were as following: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles with denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 55°C and elongation at 72°C for 30 s each. The PCR product specificity was assessed by the melting curve analysis. A 10-fold reduction of the copy number amplified by qPCR in the presence of diluted soil DNA with respect to the copy number obtained in the control reaction (water) was considered as 10 % amplification efficiency, or, conversely, as 90 % inhibition. Although inhibition tests and detection of specific targets were conducted with different mixes and primers, the DNA polymerases from the Absolute qPCR SYBR

Green ROX Mix (used for inhibition testing) and the Absolute QPCR ROX Mix (used for mycobacterial detection in environmental samples) are the same (Thermo-Start DNA polymerase). Thus, the quality of DNAs extracted from environmental samples was estimated by this method that is compatible with acceptable experimental costs associated with the high number of analysed samples.

Direct M. bovis spoligotyping from environmental DNA:

Environmental DNA samples that proved to be positive for the presence of MTBC were submitted for spoligotyping using the Luminex method described previously by Zhang et al (Zhang *et al.* 2010). Spoligotypes were named according to an agreed international convention (www.mbovis.org).

RESULTS

Validation of the qPCR assays on pure bacterial strains:

The results of the specificity test for the three qPCR assays are shown in Table 1. Using IS1561'- and Rv3866-based qPCR assays, all spoligotypes of *M. bovis* were detected with cycle threshold (Ct) values below 25 cycles as well as all strains from the other species belonging to the MTBC (*M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. pinnipedi*), except the *M. microti* species. Using the RD4-based qPCR assay, only *M. bovis* strains were detected with Ct values below 25 cycles. For the three qPCR assays, the 22 strains of the NTM and MAC members were not detected or gave Ct values above 35 cycles. Strains with Ct values above 35 cycles when using high DNA concentration from pure culture are unlikely to give any signal when testing soil metagenomic DNA where targets are highly diluted. These results indicated that IS1561'- and Rv3866-based qPCR assays are highly specific for MTBC members and exclude *M. microti* whereas the RD4-based qPCR assay is specific for *M. bovis* species.

The calibration curve used for absolute quantification is presented in Figure 2 for the IS1561'- based qPCR assay. A linear regression was established between the log (gene copy number) and the Ct value over a wide range of target concentrations from 10 to 10⁶ gene copies per PCR ($r^2=0.9989$). Below 10 target gene copies per reaction, the detection was still possible but results were not reproducible. The quantification limit of the qPCR detection system was estimated to be 10 gene copies per PCR reaction thus indicating a high sensitivity. Similar calibration curves and detection thresholds were obtained for the two other qPCR assays targeting Rv3866 and RD4 (data not shown).

Table 1: Strains used for testing oligonucleotides specificity. Results are given with Ct (Cycle Threshold). ND (not detected) means that no signal was observed after 40 cycles

Strains	Ct IS1561'	Ct Rv3866	Ct RD4
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG			
BCG str. Pasteur 1173P2	<25	<25	<25
BCG str. Danish 1331			
<i>Mycobacterium bovis</i>			
SB0089, SB0120, SB0121, SB0130, SB0134, SB0162, SB0166, SB0821, SB0823, SB0825, SB0826, SB0827, SB0878, SB0885, SB0912, SB0948, SB0999, SB1081	<25	<25	<25
Others MTBC members			
<i>Mycobacterium microti</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<25	<25	ND
<i>Mycobacterium caprae</i>	<25	<25	ND
<i>Mycobacterium pinnipedi</i>	<25	<25	ND
Non tuberculous mycobacteria			
<i>Mycobacterium avium</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium aichiense</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium arupense</i>	ND	>35	>35
<i>Mycobacterium celatum</i>	>35	ND	ND
<i>Mycobacterium chelonae</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium chitae</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium confluentis</i>	>35	ND	>35
<i>Mycobacterium elephantis</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium intermedium</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium kansai</i>	ND	>35	ND
<i>Mycobacterium non chromogenicum</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium parafinicum</i>	>35	ND	ND
<i>Mycobacterium porcinum</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium rufum</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium rutilum</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium terrae</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ND	>35	ND
<i>Mycobacterium szulgai</i>	ND	>35	ND
<i>Mycobacterium thermoresitibile</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium vaccae</i>	ND	ND	ND
<i>Mycobacterium xenopi</i>	>35	>35	>35

Detection threshold of qPCR assays in *M. bovis* BCG spiked environmental matrices:

The detection thresholds of the three qPCR assays were evaluated in complex environmental matrices (soil, feces and water) spiked with 2.5 to 2.5×10^6 CFU per g of soil or feces and 5.0 to 5.0×10^6 CFU per 100 ml of water. The quality of DNAs extracted from microcosms was assessed as described in the M&M section “Estimation of DNA quality for PCR amplification”. The results showed that 20-fold dilutions of the DNA extracts did not inhibit the qPCR assay and were thus used for all qPCR assays performed on spiked microcosms. Results of *M. bovis* detection in spiked microcosms are given in Table 4 for IS1561'-based qPCR assay. No signal was detected in control samples (not inoculated).

For *M. bovis* cell densities above 250 CFU per g of soil, 2500 CFU per g of feces and 5 CFU per g of water (or 500 CFU per 100 ml of water), the detection by the qPCR assay yielded eight to nine positive reactions out of nine repeats which allowed determination of the numbers of *M. bovis* gene copy number. In contrast, although *M. bovis* was sometimes detected in spiked material with lower densities than those described above, quantification was unreliable. A strong discrepancy between the results obtained by the culture-based method and those obtained with the qPCR assay was observed (10- to 100-fold higher for the qPCR assay). All of the microcosms were analysed with the two complementary detection systems (targeting the Rv3866 locus and the flanking region of the RD4 deletion) and similar results were obtained (data not shown). Despite soils S1 and S2 being different based on their physico-chemical characteristics, detection limits were equivalent with the three qPCR systems on these two soils.

Extrapolating these results for natural environmental samples suggest that the three qPCR assays allow a reliable quantification of MTBC (IS1561' and Rv3866) or *M. bovis* (RD4) targets in environmental samples for Ct values below 39. Above this threshold, detection may occur but lacks reproducibility. The word “traces” was then chosen in all further experiments in order to indicate that MTBC or *M. bovis* targets are present in very low quantities.

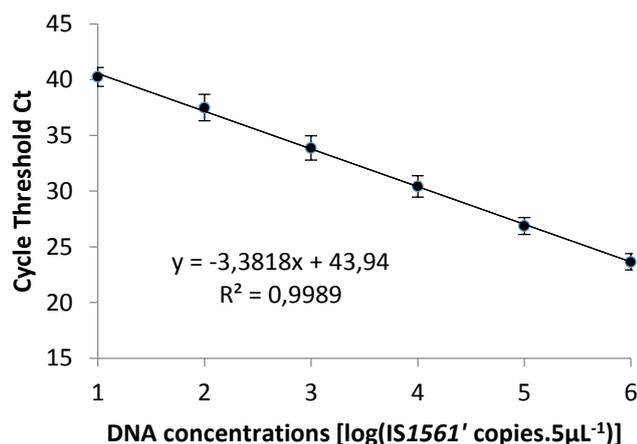


Figure 2: Standard curve used for absolute quantification of *M. bovis* in samples with IS1561' qPCR assay (Mean values of ten standard curves). Error bars represent the 95% confidence interval associated to the values.

Table 2: Properties of the two soils used for the qPCR sensitivity detection of *Mycobacterium bovis*

Site	Clay %	Loam %	Sand %	Total Carbon %	Total Nitrogen %	pH H ₂ O	Organic matter	Land use
S1	39.7	48.5	11.8	3.61	0.38	7.75	0.625	Pasture
S2	19.2	46.3	34.5	2.92	0.269	5.46	0.506	Pasture

Table 3: Sets of primers tested in this study. F: forward primer, R: reverse primer, P: Double dye probe.

Target locus	Nucleotide sequence	Location*	Size (bp)
IS1561'	F 5' GATCCAGGCCGAGAGAATCTG 3'	3742298-3742319	76
	R 5' GGACAAAAGCTTCGCCAAAA 3'	3742354-3782374	
	P 5' FAM ACGGCGTTGATCCGATTCCGC TAMRA 3'	3742332-3742353	
Nested IS1561'	F 5' AGGAAGCGGTGTAGGTGATG 3'	3742212-3742232	222
	R 5' AAGATCGACCCGAGTG 3'	3742416-3742434	
RD4	F 5' GCAGAAGCGCAACACTCTTG 3'	1692712-1692736	116
	R 5' ATCTTAGCTGGTCAATAGCCATTTTT 3'	1692802-1692827	
	P 5' FAM AGTGGCCTACAACGGCGCTCTCC 3'	1692743-1692768	
Rv3866	F 5' ACCCGCCAACGTCGAA 3'	4278658-4278673	86
	R 5' CAATTGACGCAATACGGTATCG 3'	4278721-4278743	
	P 5' FAM CGAGCTAGCCGAATGCACAACCG 3'	4278693-4278716	

* Location is given by reference to the *M. bovis* AF2122/97 genome sequence, accession n° NC_002945.3

Molecular detection of M. bovis in environmental samples:

Our molecular detection systems were first evaluated on twenty-four soils from bTB-free zones in France. Whatever the detection system, no signal was observed showing a good specificity of the IS1561', Rv3866 and RD4 qPCR systems.

Between April 2013 and December 2014, 63 samples of pasture soil, 150 samples of setts soil, 21 latrines samples, 67 water samples from naturally occurring springs (and subsequent flowing water on soil surface) within cattle pastures and 55 samples of spring sediments within 15 areas located in the bTB-endemic zone in Côte d'Or, were analysed. Some spots were sampled several times (monthly from January to June and in November) to assess the persistence of the MTBC signals. Altogether, 356 DNA samples were primarily screened using the qPCR assay targeting IS1561' locus. Molecular signals corresponding to MTBC were found in six areas out of 15 analysed and only positive results are presented in Table 5. Apparent gene copy numbers were the average value from n = 2 to n = 3 repeats. These results indicate a MTBC contamination of the environment in 40 % of the studied areas.

Among the 36 positive samples, 19 were found to be positive for MTBC detection with low signals (indicated as "Traces" in Table 5). These samples include 7 badger sett soils, 3 badger latrines, 1 sediment sample and 8 water samples from naturally occurring springs in pastures. More interestingly, high positive signals for MTBC were observed for the other 17 positive samples with 58 to 8 700 gene copies per g of soil. It is worth noting that these samples only included badger sett soils in area D and one nematodes sample in area C, while no signal was recorded for the pasture soils.

In order to confirm these positive results, some of them were subjected to the nested IS1561' qPCR assay. Eleven samples, including eight badger sett soils, two samples of water from springs and one sample of nematodes isolated from spring sediments were confirmed to be positive for MTBC detection with this nested qPCR assay. Badger sett soils from area D were sampled five times over an eight month-period. The occurrence of MTBC signal was discontinuous in the seven soils from badger setts that were sampled. However MTBC signals were detected in several badger sett soils (badger sett soils 1, 4 and 5 in Table 5) following a seven to eight months period after *M. bovis* was detected for the first time. The IS1561' gene copy numbers for the positive badger sett soils ranged levels from 2.54×10^2 to 5.05×10^4 per g of soil. The MTBC signal remained at high levels throughout the eight month-period, although the badgers moved out one month after the first sampling of the sett (Table 5). Furthermore, confirmation of *M. bovis* detection using the RD4 qPCR detection system was achieved for a few IS1561' positive samples. Only three out of eight tested samples proved to be positive with RD4-based detection system (see Table 5). This result definitely demonstrates the occurrence of *M bovis* DNA in these samples.

Spoligotyping was performed on positive DNA samples and the results are shown in Table 6. A badger sett soil DNA was fully spoligotyped and found to belong to the SB0120 *M. bovis* spoligotype,

which is responsible for cattle and wildlife infection in this area of Côte d'Or. Partial *M. bovis* spoligotypes were obtained for three badger sett soils DNAs. The two other partial spoligotypes did not allow identification of the species within the MTBC.

Table 4: Evaluation of the detection of the IS1561' qPCR assay with DNA extracted from control and spiked test matrices.

Number of <i>M. bovis</i> spiked per g of dry soil or per 100 mL of water	Number of positive PCR/ 9 reactions	Mean Ct	Standard deviation Ct	Mean IS1561' genome-equivalent per g of soil or feces or 100 mL of water
Soil S1				
Control soil	0	ND	ND	ND
2.5	1	39.6	ND	Traces*
2.5.10 ¹	1	39.4	ND	Traces*
2.5.10 ²	8	38.9	1	(6.54 ± 3.66) × 10 ³
2.5.10 ³	9	34.5	0.5	(2.17 ± 0.86) × 10 ⁵
2.5.10 ⁴	9	30.2	0.2	(2.18 ± 0.26) × 10 ⁶
2.5.10 ⁵	9	27.6	0.5	(1.32 ± 0.39) × 10 ⁷
Soil S2				
Control soil	0	ND	ND	ND
2.5	0	ND	ND	ND
2.5.10 ¹	5	40.4	0.6	Traces*
2.5.10 ²	9	38.1	0.7	(8.00 ± 3.19) × 10 ³
2.5.10 ³	9	34.2	0.4	(1.41 ± 0.49) × 10 ⁵
2.5.10 ⁴	9	29.6	0.5	(3.74 ± 1.61) × 10 ⁶
2.5.10 ⁵	9	26.7	0.7	(2.65 ± 1.85) × 10 ⁷
Water				
Control water	0	ND	ND	ND
5.10 ¹	1	40.1	ND	Traces*
5.10 ²	9	38.1	1.1	(2.20 ± 1.45) × 10 ⁴
5.10 ³	9	35.1	0.5	(1.48 ± 0.58) × 10 ⁵
5.10 ⁴	9	31	1.6	(3.20 ± 1.34) × 10 ⁶
5.10 ⁵	9	25.9	0.3	(8.19 ± 2.09) × 10 ⁷
5.10 ⁶	9	22.8	0.3	(6.98 ± 1.31) × 10 ⁸
Badger feces				
Control feces	0	ND	ND	ND
2.5.10 ¹	0	ND	ND	ND
2.5.10 ²	1	39.9	ND	Traces*
2.5.10 ³	9	37.9	1.05	(2.32 ± 0.77) × 10 ⁴
2.5.10 ⁴	9	34.7	1.59	(2.12 ± 1.87) × 10 ⁵
2.5.10 ⁵	9	31.2	2.03	(2.44 ± 2.86) × 10 ⁶
2.5.10 ⁶	9	26.1	0.59	(3.36 ± 1.07) × 10 ⁷

*Traces means that IS1561' signal was detected but that quantification was unreliable (Ct value above 39).

Table 5: Molecular detection of MTBC or *M. bovis* targets in positive environmental samples from 6 areas in Côte d'Or. Only positive samples are presented. MTBC gene copy numbers were computed from calibration curve and amounts of DNA extracted from the various samples (n=2 ou n=3).

Area	Type of sample	Sampling date	Mean MTBC gene copy numbers g ⁻¹ of soil or feces (IS1561' qPCR assay)	Confirmation after IS1561'-nested PCR	Confirmation of presence of <i>M. bovis</i> after RD4 qPCR assay
A	Badger sett soil	June 2013	Traces *	Negative	NT †
B	Spring water 1	January 2014	Traces	Negative	Negative
		February 2014	Traces	Negative	Negative
		March 2014	Traces	Negative	Negative
C	Spring water 1	February 2014	Traces	Positive	NT
	Spring water 2	February 2014	Traces	Negative	NT
	Sediments	February 2014	Traces	Negative	NT
	Soil nematodes	February 2014	5.82.10 ¹	Positive	NT
D	Badger sett soil 1	March 2014	1.93.10 ³	Positive	Positive
		November 2014	5,77.10 ³	NT	NT
	Badger sett soil 2	March 2014	8.70.10 ³	Positive	Positive
		May 2014	5.02.10 ²	Positive	NT
		June 2014	1.43.10 ³	NT	NT
	Badger sett soil 3	March 2014	4.41.10 ²	Positive	Negative
		May 2014	7.41.10 ³	Positive	NT
		June 2014	2.82.10 ³	NT	NT
	Badger sett soil 4	April 2014	4.46.10 ³	Positive	Negative
		May 2014	2.36.10 ³	NT	NT
		June 2014	5.02.10 ²	NT	NT
		November 2014	6,07.10 ³	NT	NT
	Badger sett soil 5	April 2014	2.48.10 ³	Positive	Positive
		May 2014	2.54.10 ²	NT	NT
		June 2014	2.02.10 ³	NT	NT
		November 2014	3,60.10 ³	NT	NT
	Badger sett soil 6	November 2014	Traces	NT	NT
	Badger sett soil 7	November 2014	Traces	NT	NT
	Latrine 1	March 2014	Traces	Negative	NT
	Latrine 2	March 2014	Traces	Negative	NT
	E	Spring water 1	March 2014	Traces	Negative
Spring water 2		March 2014	Traces	Positive	NT
Spring water 3		March 2014	Traces	Negative	NT
Badger sett soil 1		March 2014	Traces	Negative	NT
Badger sett soil 2		March 2014	Traces	Negative	NT
Latrine 1		March 2014	Traces	Negative	NT
F	Badger sett soil 1	June 2014	Traces	Negative	NT
	Badger sett soil 2	June 2014	Traces	Positive	NT

*Traces: MTBC targets were present but MTBC genome equivalent were not calculated since Ct were close to the detection limit of the method.

† NT not tested

DISCUSSION

Mycobacterium bovis is described as an obligate intracellular microorganism transmitted by direct contact between mammalian hosts. However, direct contacts between species seem to be scarce and indirect transmission, involving environmental matrices, is likely to occur (Böhm *et al.* 2009; Kukielka *et al.* 2013). Many studies have clearly demonstrated the presence and the persistence of *M. bovis* in naturally infected environmental substrates in bTB endemic regions of United Kingdom (Young *et al.* 2005; Courtenay *et al.* 2006; Sweeney *et al.* 2006; Sweeney *et al.* 2007; King *et al.* 2015a; King *et al.* 2015b). Evaluation of the environment as a reservoir of *M. bovis* could help to understand its epidemiological significance and its role in the indirect transmission of the disease among livestock and wildlife. To our knowledge, the results from our study demonstrate for the first time the contamination of environmental matrices with MTBC and more specifically *M. bovis* in Côte d'Or, which is a region where bTB is endemic in cattle and wildlife.

qPCR detection is a method of choice for *M. bovis* environmental monitoring since it is a faster alternative to culture based methods that are hampered by the slow-growing rate of *M. bovis* and the high number and diversity of microbial communities. Moreover, PCR is able to detect *M. bovis* DNA in the environment over a long period following initial contamination with a relatively high sensitivity (Adams *et al.* 2013).

The detection of *M. bovis* in environmental samples (soil, water and feces) that contain highly diverse microbial communities, including numerous described and potentially non-described NTM (Falkinham 2009) was still a challenge. The two qPCR assays developed in this study (IS1561' and Rv3866 targets) proved to be specific for the MTBC excluding *M. microti*. These results are in agreement with the fact that IS1561' is present in the genomes of all the members of the MTBC except in *M. microti* (Gordon *et al.* 1999; Brodin *et al.* 2002; Huard *et al.* 2003). It's worth noting that *M. microti* is quite widespread in animals in France (Michelet *et al.* 2015) and thus may also occur in environmental matrices (Courtenay *et al.* 2006). The refined RD4 qPCR assay was shown to be highly specific for *M. bovis* species, in agreement with previous results (King *et al.* 2015a). Although some strains gave Ct > 35 when concentrated in pure culture with these molecular assays, these targets would not be detected in natural samples due to extreme dilution in highly complex environmental DNAs.

The DNA extraction method used in this study proved to be highly efficient in soils harboring different physico-chemical characteristics (especially in clayey soils) (Dequiedt *et al.* 2011; Locatelli *et al.* 2013). The large mass of samples (2 g) allowed a better representativeness of sampling to overcome the potential heterogeneity of substrates, *i.e.* a physical heterogeneity as well as a heterogeneous distribution of mycobacteria in environmental samples. The use of an amplification facilitator (T4 bacteriophage gene 32 product) allowed minimizing PCR inhibition by co-extracted contaminants (Matheson *et al.* 2010; Opel *et al.* 2010) and significantly improving *M. bovis* detection. In previous

published studies (Travis et al. 2011; Pontiroli et al. 2011; Sweeney et al. 2007), DNA extraction was usually achieved from smaller masses (0,1 to 0,5 g) of soil or feces using commercial DNA extraction kit in order to limit PCR inhibition.

The three qPCR assays developed in this study, using 20-fold dilutions of DNA extracts of spiked samples allowed a reliable detection of spiked *M. bovis* (BCG strain) at levels as low as 2.5×10^2 CFU to 2.5×10^3 CFU g⁻¹ of sample, providing an improved detection limit compared to a recent study where detection limit was 4.0×10^4 CFU g⁻¹ soil and 5.0×10^5 CFU ml⁻¹ water (Santos *et al.* 2015). In other previous studies, detection limits were estimated to 8.5×10^3 cells g⁻¹ for soil and 4.25×10^5 cells g⁻¹ for fecal samples using the original RD4 qPCR assay (Pontiroli *et al.* 2011; Travis *et al.* 2011). As cell numbers were estimated by fluorescent dye assisted flow cytometry, comparison with our results is difficult. Finally, King *et al.* (King *et al.* 2015a; King *et al.* 2015b) were able to detect 10^3 *M. bovis* genome equivalents per g⁻¹ for badger feces.

In our study, the detection limits are equivalent for the three qPCR systems developed or refined whatever the physico-chemical characteristics of the soils.

The 10- to 100-fold discrepancy between bacterial numbers obtained using culture based methods and qPCR based methods that we observed could be explained by the underestimation of cultivable bacteria due to cell aggregation (linked to a strong hydrophobicity of mycobacteria cell wall) in inoculum, as well as the occurrence of viable but not cultivable cells (VBNC) and cell mortality (with persistence of DNA). Similar discrepancies have already been observed in previous studies (e.g. Betelli *et al.* 2013).

Though similar detection thresholds were observed for the three systems in spiked samples, RD4 and RV3866 based qPCR assays seemed less sensitive than IS1561'-based detection system in environmental samples (range of 2 Ct between IS1561' and the 2 other systems). However, the occurrence of RD4 based positive signals in several samples gave an additional proof of the specific detection of *M. bovis*. Furthermore, the direct spoligotyping of DNA extracted from environmental matrices confirmed for the first time the presence of *M. bovis* in several environmental samples in France.

All 63-pasture soil samples from the bTB endemic area in Côte d'Or were found to be negative for the presence of MTBC (below the detection threshold). Failure to detect MTBC in pasture soil samples can be related to the low prevalence of bTB in cattle in the sampling areas (herd prevalence reached 0.8 % in 2014, Cote d'Or Regional Veterinary Service) and the low prevalence of bTB infection in badgers which territories overlap the sampled pastures (Payne *et al.* 2012). This result might reflect the high dilution rate of *M. bovis* targets in soil DNA extracts which contains high numbers of other microorganisms (abundant soil microbial communities containing up to 10^{10} genomes per g of soil). The discontinuous (spatial and temporal) distribution of *M. bovis* in soil pasture, because of

intermittent and/or low shedding (Neill *et al.* 1988; Clifton-Hadley *et al.* 1993), might also limit the detection of *M. bovis* in soil samples. Despite the high number of soil sample analyzed, financial and time constraints have limited more intensive sampling efforts that could have overcome this limit.

MTBC signal was detected in 10.1 % (7 positive out of 67) of the water samples taken from naturally occurring springs with the IS1561' qPCR assay. As the level of detection was close to the detection threshold, we were unable to quantify MTBC signals. Interestingly, one sample of nematodes originated from sediments located in close vicinity of one of the positive sources was also found positive for the presence of MTBC. Although nematodes are known to host bacterial pathogen, no data is available concerning MTBC. This intriguing result would require further investigations. These water springs (and accompanying flowing water) are located in pastures where both cattle and wildlife have access for drinking. In several pastures (four sites), water was sampled along the slope, following the gravitational water flow. In two of these pastures we repeatedly found (two to three) positive samples, indicating multiple point contamination of spring and flowing water along these slopes (see Figure 3 for localization of positive samples in one of these pastures). This result is an important new finding of our study that can support several hypotheses on the role of water in the dissemination of MTBC in the environment and in animal contamination. We can hypothesize from these results that bioaerosols formation from contaminated water and subsequent inhalation by animals (cattle and wildlife) might contribute to animal infection with MTBC members, especially as the infective dose through this transmission route is very low (< 10 CFU) (Dean *et al.* 2005; Corner *et al.* 2007). Infection of animals might also occur through oral route by repeatedly drinking contaminated water.

A special effort was made to monitor the contamination of badger sett soils since bTB infected badgers were detected in our study area. Between 2009 and 2011, 878 badgers had been trapped and analyzed in the infected area of Côte d'Or (Payne *et al.* 2012). Macroscopic lesions were present in 1.9 % of them, despite culture-based method detecting 5.6 % of positive badgers. Only one badger showed widespread tuberculosis. Moreover, in this infected area numerous badger setts were located either within pastures or in close vicinity (forest-pasture interface). Our study demonstrated an average prevalence of MTBC of 7.3% (11 out of 150) in soils from badger setts with the highest gene copy number up to 3.7×10^4 gene copies g^{-1} of soil observed among environmental samples analysed in our study. The prevalence of MTBC molecular signature in latrines was estimated to 7 % (3 positive out of 21). Our results demonstrate that infected badgers might contaminate their close environment for the first time in France. Indeed, infected badgers have been shown to excrete *M. bovis* from the respiratory, digestive and urinary tracts, and in bite wounds exudates (Gavier-Widen *et al.* 2001; Corner *et al.* 2012). Our results are in agreement with previous findings from several studies in UK (Young *et al.* 2005; Courtenay *et al.* 2006; Sweeney *et al.* 2007; King *et al.* 2015a) that recovered *M. bovis* from badger setts, latrines and adjacent fields with gene copy numbers ranging from 1×10^3 to 5.4×10^6 per g of

soil. In Woodchester Park in UK, where badgers populations have been extensively studied for more than 20 years, bTB prevalence was estimated around 30 % in 2005, which might explain high numbers of positive setts and latrines observed in this area (Courtenay *et al.* 2006; King *et al.* 2015a). As suggested by Courtenay *et al.* (Courtenay *et al.* 2006), the low bTB prevalence of infected sett soils observed in our study may be linked to the low prevalence and the low density of badgers excreting the bacteria within their social group.

Finally, in soils of 7 badger setts we were able to detect *M. bovis* signatures (RD4 positive qPCR), either continuously (4 setts) or discontinuously (3 setts). The presence of *M. bovis* was confirmed by direct soil DNA spoligotyping (see Table 6) in soils of the setts. The presence of *M. bovis* molecular signatures was proved over an eight month-period (despite the badgers moved out). These results are in agreement with a previous study where positive molecular detection of *M. bovis* was demonstrated over a period of 15 months, despite the badgers having moved out (Young *et al.* 2005). To our knowledge, this is the first time that spoligotype SB0120 was observed by direct spoligotyping of soil DNA, this spoligotype being identical to the spoligotype of strains isolated from cattle and wildlife in these sites (Payne *et al.* 2012).

Although the molecular detection of MTBC or *M. bovis* by specific qPCR assay doesn't give any information about mycobacterial viability, Young *et al.* (Young *et al.* 2005) demonstrated that MTBC DNA did not persist in soil for more than ten days, suggesting that DNA detected in our environmental samples could belong to viable cells.

A remaining challenge is to develop adequate methods to cultivate *M. bovis* from environmental matrices. Indeed, culture based methods might also be impaired by the occurrence of VBNC state or dormancy in *M. bovis* present in environmental matrices as previously suggested by Whittington *et al.* (Whittington *et al.* 2004) for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Further work is needed to assess if VBNC or dormancy occur in *M. bovis* under environmental conditions.

Although we concentrated our sampling efforts on badger environment, it is however acknowledged that in Côte d'Or *M. bovis* circulates in a multi-host system that includes also wild boar and deer. We can thus hypothesize that these wild animals can also contribute to the shedding of *M. bovis* in the environment.

Further research is needed to understand the ecology of *M. bovis* in the environment and its epidemiological role in indirect transmission. This knowledge would help to improve herd management, in reducing indirect contacts between livestock and wildlife, in controlling water access in areas considered as "at risk" and in preventing contacts with badger setts for example. Biosecurity should thus be an integral part of the long-term strategy for the management of bovine tuberculosis in Côte d'Or.

Acknowledgements

The authors thank F. Chevalier and M. Béral from the CIREV (Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie Vétérinaire), A.E. Taconet, F. Barthélémy and T. Grosjean from the Cote d'Or Regional Veterinary Service (DDPP21). We are grateful to the cattle breeders, trappers and hunters who helped us during this study. We wish also to thank C. Ferrier from ONCFS (National Game Hunting and Wildlife Agency), Dominique Meunier and Luc Biju-Duval from INRA Dijon, Céline Richomme from ANSES. The work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne and Conseil Général de Côte d'Or, Interbev, GDS Côte d'Or.

Conflict of interest

No conflict of interest declared

References

- Adams, A.P., Bolin, S.R., Fine, A.E., Bolin, C.A. and Kaneene, J.B. (2013) Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Appl Environ Microbiol* **79**, 6501-6506.
- Aranaz, A., De Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A. and Domínguez, L. (2004) Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol* **42**, 2602-2608.
- Betelli, L., Duquenne, P., Grenouillet, F., Simon, X., Scherer, E., Gehin, E. and Hartmann, A. (2013) Development and evaluation of a method for the quantification of airborne *Thermoactinomyces vulgaris* by real-time PCR. *J Microbiol Methods* **92**, 25-32.
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F. and Guilloteau, L.A. (2005) Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* **36**, 411-436.
- Böhm, M., Hutchings, M.R. and White, P.C.L. (2009) Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. *PLoS One* **4**, e5016.
- Brodin, P., Eiglmeier, K., Marmiesse, M., Billault, A., Garnier, T., Niemann, S., Cole, S.T. and Brosch, R. (2002) Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect Immun* **70**, 5568-5578.
- Clifton-Hadley, R.S., Wilesmith, J.W. and Stuart, F.a. (1993) *Mycobacterium bovis* in the European badger (*Meles meles*): epidemiological findings in tuberculous badgers from a naturally infected population. *Epidemiol Infect* **111**, 9-19.
- Corner, L.A., O'Meara, D., Costello, E., Lesellier, S. and Gormley, E. (2012) The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *Vet J* **194**, 166-172.
- Corner, L.A., Costello, E., Lesellier, S., O'Meara, D., Sleeman, D.P. and Gormley, E. (2007) Experimental tuberculosis in the European badger (*Meles meles*) after endobronchial

inoculation of *Mycobacterium bovis*: I. Pathology and bacteriology. *Res Vet Sci* **83**, 53-62.

- Courcoul, A., Moyen, J.-L., Brugère, L., Faye, S., Hénault, S., Gares, H. and Boschioli, M.-L. (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**, e90334.
- Courtenay, O., Reilly, L.A., Sweeney, F.P., Hibberd, V., Bryan, S., Ul-Hassan, A., Newman, C., Macdonald, D.W., Delahay, R.J., Wilson, G.J. and Wellington, E.M.H. (2006) Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biol Lett* **71**, 1946-1952.
- Dean, G.S., Rhodes, S.G., Coad, M., Adam, O., Cockle, P.J., Clifford, D.J., Hewinson, R.G. and Vordermeier, H.M. (2005) Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun* **73**, 6467-6471.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.a., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, a., Lemanceau, P. and Ranjard, L. (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecol Biogeogr* **20**, 641-652.
- Falkinham, J.O. (2009) Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* **107**, 356-367.
- Fediaevsky, A., Courcoul, A., Boschioli, M.-L. and Reveillaud, E. (2014) Tuberculose bovine en France: résultats d'une stratégie plus offensive. *Bull Epid Santé Anim Alim* **64**, 4-11.
- Fine, A.E. (2006) The role of indirect transmission in the epidemiology of bovine tuberculosis in cattle and white-tailed deer in Michigan. *Michigan Bovine Tuberculosis Bibliography and Database Paper* <http://digitalcommons.unl.edu/michbovinetb/33/>.
- Fine, A.E., Bolin, C.a., Gardiner, J.C. and Kaneene, J.B. (2011) A study of the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural weather conditions in Michigan, USA. *Vet Med Int* **2011**.
- Garnett, B.T., Delahay, R.J. and Roper, T.J. (2002) Use of cattle farm resources by badgers (*Meles meles*) and risk of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) transmission to cattle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **269**, 1487-1491.
- Gavier-Widen, D., Chambers, M.A., Palmer, N., Newell, D.G. and Hewinson, R.G. (2001) Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. *Vet Rec* **148**, 299-304.
- Ghodbane, R., Mba Medie, F., Lepidi, H., Nappéz, C. and Drancourt, M. (2014) Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology* **160**, 496-501.
- Gordon, S.V., Heym, B., Parkhill, J., Barrell, B. and Cole, S.T. (1999) New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **145**, 881-892.
- Gortázar, C., Torres, M.J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., Negro, J.J. and Aznar-Martín, J. (2008) Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: The role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS One* **3**, e2776.

- Hauer, A., Cruz, K.D., Cochard, T., Godreuil, S., Karaoui, C., Henault, S., Bulach, T., Banuls, A.L., Biet, F. and Boschioli, M.-L. (2015) Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One* **10**, e0117103.
- Huard, R.C., de Oliveira Lazzarini, L.C., Butler, W.R., van Soolingen, D. and Ho, J.L. (2003) PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* **41**, 1637-1650.
- Huard, R.C., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, L.C.O., van Soolingen, D., Cousins, D. and Ho, J.L. (2006) Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol* **188**, 4271-4287.
- King, H.C., Murphy, A., James, P., Travis, E., Porter, D., Hung, Y.-J., Sawyer, J., Cork, J., Delahay, R.J., Gaze, W., Courtenay, O. and Wellington, E.M. (2015a) The variability and seasonality of the environmental reservoir of *Mycobacterium bovis* shed by wild European badgers. *Sci Rep* **5**, 1-7.
- King, H.C., Murphy, A., James, P., Travis, E., Porter, D., Sawyer, J., Cork, J., Delahay, R.J., Gaze, W., Courtenay, O. and Wellington, E.M. (2015b) Performance of a noninvasive test for detecting *Mycobacterium bovis* shedding in European badger (*Meles meles*) populations. *J Clin Microbiol* **53**, 2316-2323.
- Kukielka, E., Barasona, J.A., Cowie, C.E., Drewe, J.A., Gortazar, C., Cotarelo, I. and Vicente, J. (2013) Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Prev Vet Med* **112**, 213-221.
- Little, T.W., Naylor, P.F. and Wilesmith, J.W. (1982) Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. *Vet Rec* **111**, 550-557.
- Locatelli, A., Depret, G., Jolivet, C., Henry, S., Dequiedt, S., Piveteau, P. and Hartmann, A. (2013) Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods. *J Microbiol Methods* **93**, 242-250.
- Matheson, C.D., Gurney, C., Esau, N. and Lehto, R. (2010) Assessing PCR inhibition from humic substances. *Open Enzym Inhib J* **3**, 38-45.
- Michelet, L., de Cruz, K., Zanella, G., Aaziz, R., Bulach, T., Karoui, C., Hénault, S., Joncour, G. and Boschioli, M.L. (2015) Infection with *Mycobacterium microti* in animals in France. *J Clin Microbiol* **53**, 981-985.
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U. and Jackson, R. (1994) The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol* **40**, 153-177.
- Neill, S., Hanna, J., O'Brien, J. and McCracken, R. (1988) Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet Rec* **123**, 340-343.
- Oostenbrink, M. (1960) Estimating nematode populations by some selected methods. *Nematology* **6(8)**, 165-2015.
- Opel, K.L., Chung, D. and McCord, B.R. (2010) A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci* **55**, 25-33.
- Palmer, M.V., Waters, W.R. and Whipple, D.L. (2004) Investigation of the transmission of

- Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am J Vet Res* **65**, 1483-1489.
- Payne, A. (2014) Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de *Mycobacterium bovis* et risque de transmission entre faune sauvage et bovins : étude expérimentale en Côte d'Or. In *Epidemiologie*: Université Claude Bernard Lyon 1. <http://www.theses.fr/2014LYO10040>
- Payne, A., Boschioli, M.L., Gueneau, E., Moyen, J.L., Rambaud, T., Dufour, B., Gilot-Fromont, E. and Hars, J. (2012) Bovine tuberculosis in "Eurasian" badgers (*Meles meles*) in France. *Eur J Wildlife Res* **59**, 331-339.
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A. and Teverson, R. (2003) The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci* **74**, 1-15.
- Pontioli, A., Travis, E.R., Sweeney, F.P., Porter, D., Gaze, W.H., Mason, S., Hibberd, V., Holden, J., Courtenay, O. and Wellington, E.M.H. (2011) Pathogen quantitation in complex matrices: a multi-operator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition. *PLoS One* **6**, e17916.
- Radomski, N., Roguet, A., Lucas, F.S., Veyrier, F.J., Cambau, E., Accrombessi, H., Moilleron, R., Behr, M.A. and Moulin, L. (2013) *atpE* gene as a new useful specific molecular target to quantify *Mycobacterium* in environmental samples. *BMC Microbiol* **13**: 277.
- Richomme, C., Boschioli, M.L., Hars, J., Casabianca, F. and Ducrot, C. (2010) Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean island, Corsica. *J Wildl Dis* **46**, 627-631.
- Santos, N., Santos, C., Valente, T., Gortazar, C., Almeida, V. and Correia-Neves, M. (2015) Widespread environmental contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex revealed by a molecular detection protocol. *PLoS One* **10**, e0142079.
- Slana, I., Kaevska, M., Kralik, P., Horvathova, A. and Pavlik, I. (2010) Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Vet Microbiol* **144**, 437-443.
- Sweeney, F.P., Courtenay, O., Hibberd, V., Hewinson, R.G., Reilly, L.A., Gaze, W.H. and Wellington, E.M.H. (2007) Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by Real-Time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7471-7473.
- Sweeney, F.P., Courtenay, O., Ul-Hassan, A., Hibberd, V., Reilly, L.A. and Wellington, E.M.H. (2006) Immunomagnetic recovery of *Mycobacterium bovis* from naturally infected environmental samples. *Lett Appl Microbiol* **43**, 364-369.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E.C. and Bodmer, T. (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**, 175-178.
- Thornton, C.G., MacLellan, K.M., Brink, T.L., Lockwood, D.E., Romagnoli, M., Turner, J., Merz, W.G., Schwalbe, R.S., Moody, M., Lue, Y. and Passen, S. (1998) Novel method for processing respiratory specimens for detection of mycobacteria by using C-18-carboxypropylbetaine: Blinded study. *J Clin Microbiol* **36**, 1996-2003.
- Travis, E.R., Gaze, W.H., Pontioli, A., Sweeney, F.P., Porter, D., Mason, S., Keeling, M.J.C., Jones, R.M.,

- Sawyer, J., Aranaz, A., Rizaldos, E.C., Cork, J., Delahay, R.J., Wilson, G.J., Hewinson, R.G., Courtenay, O. and Wellington, E.M.H. (2011) An inter-laboratory validation of a real time PCR assay to measure host excretion of bacterial pathogens, particularly of *Mycobacterium bovis*. *PLoS One* **6**, e27369.
- Whittington, R., Marshall, D., Nicholls, P.J., Marsh, I.B. and Reddacliff, L.A. (2004) Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2989-3004.
- Young, J.S., Gormley, E. and Wellington, E.M. (2005) Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1946-1952.
- Zanella, G., Durand, B., Hars, J., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., Duvauchelle, A., Ferme, M., Karoul, C. and Boschioli, M.L. (2008) *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *J Wildl Dis* **44**, 99-108.
- Zhang, J., Abadia, E., Refregier, G., Tafaj, S., Boschioli, M.L., Guillard, B., Andremont, A., Ruimy, R. and Sola, C. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of spoligotyping with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol* **59**, 285-294.

C. CAMPAGNES DE PRELEVEMENTS SUPPLEMENTAIRES

Entre décembre 2014 et mars 2015, deux campagnes de prélèvement d'échantillons environnementaux supplémentaires ont été réalisées dans la zone endémique de Côte d'Or, ainsi qu'une campagne en Charente, où des foyers bovins et sauvages sont recensés respectivement depuis 2006 et 2009.

1. Fin des prélèvements en Côte d'Or

Les prélèvements ont concerné d'une part une forêt domaniale à cheval sur deux communes de la zone Sud (étoiles blanches sur la Figure 19) dans laquelle nous nous sommes focalisés sur les trous d'eau fréquentés par les sangliers et les cervidés. Cinq trous d'eau importants et fréquentés ont été ciblés et sur chacun, trois prélèvements de sols/sédiments et deux prélèvements d'eau ont été réalisés en décembre 2014. D'autre part, des prélèvements ont été effectués dans les terriers de blaireaux infectés de la commune D citée dans l'article précédent que nous suivons depuis mars 2014 et dans laquelle 1 à 3 blaireaux infectés sont piégés tous les ans, ainsi que dans des terriers fréquentés d'une commune limitrophe (commune G) sur laquelle un blaireau infecté a été piégé en 2014. Quatorze sols de terriers (5 sur la commune D et 9 sur la commune G) et cinq latrines proches des terriers (3 sur D et 2 sur G) ont été prélevés en mars 2015. Ces deux sites sont représentés par les étoiles noires sur la Figure 19. Tous ces échantillons ont été analysés selon les techniques décrites dans l'article précédent (section Matériel et méthodes).

Les vingt-cinq échantillons prélevés dans la forêt domaniale de la zone Sud en décembre 2014 n'ont donné aucun signal moléculaire avec le système de détection ciblant l'*IS1561*'. Dans cette zone forestière, aucun animal sauvage infecté n'a été détecté depuis 2013.

Concernant les terriers et latrines de la commune D, les cinq échantillons de sols de terriers analysés et une des deux latrines ont donné un signal moléculaire positif pour le MTBC. Pour l'un des sols, la quantification n'a pas été possible avec la qPCR (Ct > 39 : traces). Pour les quatre autres sols, des valeurs de 1.0×10^4 à 4.6×10^4 copies de gènes ont été obtenues et de 1.2×10^4 copies de gènes pour la latrine. Trois des échantillons de sol ont donné un résultat positif avec la PCR nichée ciblant l'*IS1561*'. Dans ces terriers, les prélèvements réalisés en mars, avril, mai, juin et novembre 2014 puis mars 2015 ont montré une persistance du signal moléculaire au cours du temps. Pour quatre des terriers, le signal a été détecté à chaque campagne de prélèvements, alors que pour trois autres, la détection a été intermittente. Il est intéressant de noter que les valeurs obtenues en mars 2015 sont supérieures à celles obtenues en 2014 (voir article précédent). Plusieurs hypothèses sont émises pour

expliquer ce résultat. La première est liée au fait que les terriers étaient habités lors de nos prélèvements en mars 2015, alors qu'ils ne l'étaient plus après les prélèvements de mars 2014.

La surveillance vidéo réalisée sur ces terriers a montré que les terriers ont à nouveau été occupés à partir de septembre 2014. Il est possible que cette occupation ait généré l'extériorisation de sol profond et de litière potentiellement plus contaminés et que nous ayons prélevé ce sol d'origine profonde. La seconde hypothèse est liée au fait que nous avons prélevé plus profondément dans le terrier que dans les campagnes de prélèvements précédentes (utilisation d'un aspirateur). Enfin, il est également possible que le groupe de blaireaux peuplant ce terrier possède un ou plusieurs animaux infectés et excréteurs à l'origine d'une contamination plus importante du sol du terrier. Ces terriers sont situés dans le bosquet d'un pré qui fournit aux bovins de l'ombre et de la fraîcheur en été et un abri en cas de pluie ou de vent. La surveillance vidéo de cette zone nous a permis d'observer que plusieurs veaux ont régulièrement exploré les entrées de gueules et consommé les brins d'herbe autour de ces entrées (surveillance vidéo).

Sur les neuf échantillons de sol prélevés dans la commune G, deux ont donné un signal positif pour le MTBC. Pour l'un d'eux, seules des traces de *M. bovis* ont été détectées, pour l'autre le nombre de copies de gènes a été estimé à 1.2×10^4 . La PCR nichée s'est révélée négative pour les deux échantillons.

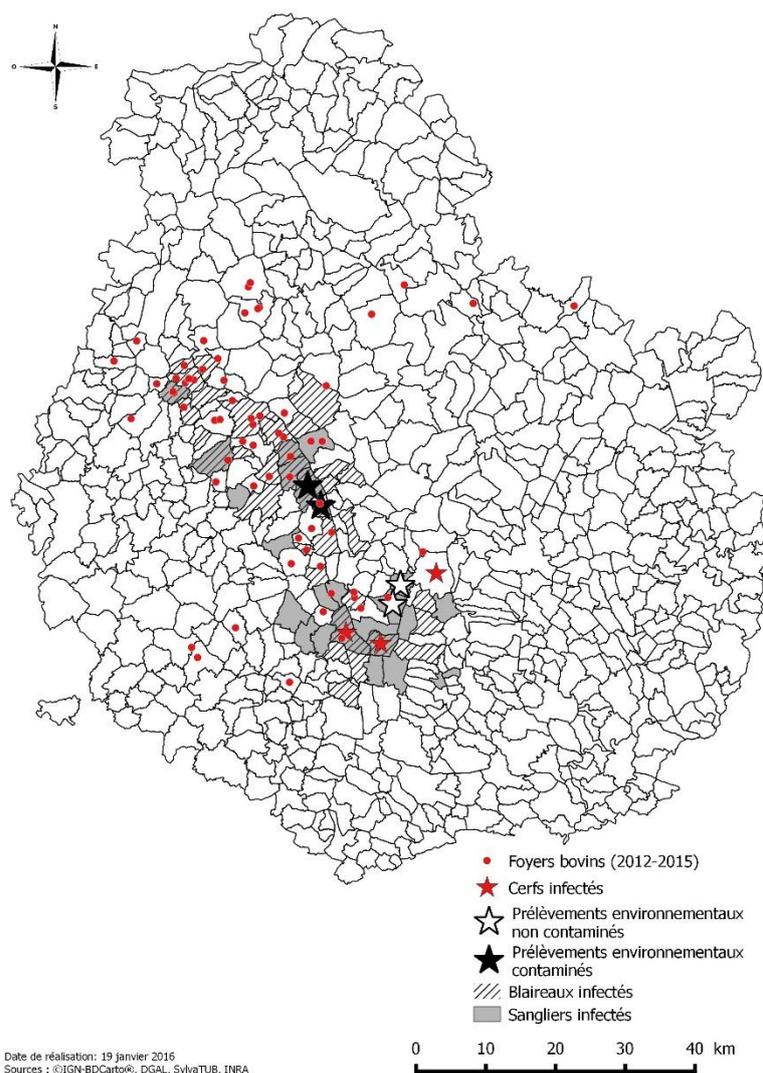


Figure 19: Localisation des communes de Côte d'Or sur lesquelles de foyers bovins et des animaux sauvages infectés ont été détectés et localisation des prélèvements environnementaux effectués en 2015 (les prélèvements positifs sont représentés par des étoiles noires) (Réalisation : Marina Béral, CIREV Bourgogne)

2. Prélèvements en Charente

Depuis 2006, 25 foyers bovins ont été détectés en Charente, avec 12 foyers pour la seule année 2014 et la découverte de foyers anciens qui évoluaient à bas bruit (communication personnelle, DDPP16). Depuis 2009, l'infection est mise en évidence chez les blaireaux (6 positifs en 2013 et 11 en 2014) et les sangliers (8 positifs en 2014 ; données Sylvatub) et un chevreuil en 2015 (Communication personnelle, Sylvatub) autour des foyers bovins avec les mêmes spoligotypes. Le système multi-hôtes observé diffère donc de celui de la Côte d'Or, puisqu'à l'heure actuelle l'infection n'a pas été observée chez les cerfs, dont les densités sont beaucoup moins importantes qu'en Côte d'Or. Les foyers bovins

et sauvages sont majoritairement localisés dans le sud du département, dans une zone limitrophe de la Dordogne, département fortement infecté depuis 2005 (Figure 20).

A la demande de la DDPP16, nous sommes allés prélever des échantillons environnementaux dans le Sud du département, dans sept communes fortement touchées par la maladie (Figure 20). Entre avril et mai 2015, 55 échantillons environnementaux (50 échantillons de sol de terrier de blaireau, 3 sols de souille, 1 latrine de blaireau et 1 fèces de sanglier) ont été prélevés sur 7 communes de Charente. Ces communes font l'objet de la déclaration d'un ou plusieurs foyers bovins de tuberculose bovine et/ou d'animaux sauvages infectés (Figure 20). De plus, 3 échantillons de matières fécales prélevés pendant l'autopsie de 3 blaireaux (BLAIR 7057, BLAIR 7058 et BLAIR 7061) ont été analysés. Six échantillons positifs ont été mis en évidence sur les 55 analysés. La qPCR ciblant l'*IS1561'* a permis de détecter et de quantifier *M. bovis* dans quatre ADN de sol de terrier avec un nombre de copies de gènes variant de $1,1 \times 10^3$ à $5,4 \times 10^3$ par g de sol. Deux échantillons supplémentaires (1 sol de souille et 1 sol de terrier) ont donné un signal non quantifiable avec la qPCR (traces). Tous les échantillons positifs ont été prélevés sur une même commune sur 2 lieux-dits différents : Maine-Joli (4 sols de terrier) et la Tuilerie (1 sol de terrier et 1 sol de souille). A notre connaissance, 2 blaireaux et 3 sangliers infectés ont été découverts à proximité du lieu-dit la Tuilerie début 2015 (Source DDPP16). Lors de notre campagne de prélèvement, tous les terriers détectés positifs étaient fréquentés. Les ADN des échantillons positifs ont été envoyés à l'ANSES pour génotypage. Aucun ADN n'a toutefois pu être spoligotypé. Les fèces de blaireaux (BLAIR 7057, BLAIR 7058 et BLAIR 7061) prélevés lors des autopsies n'ont donné aucun signal avec la qPCR.

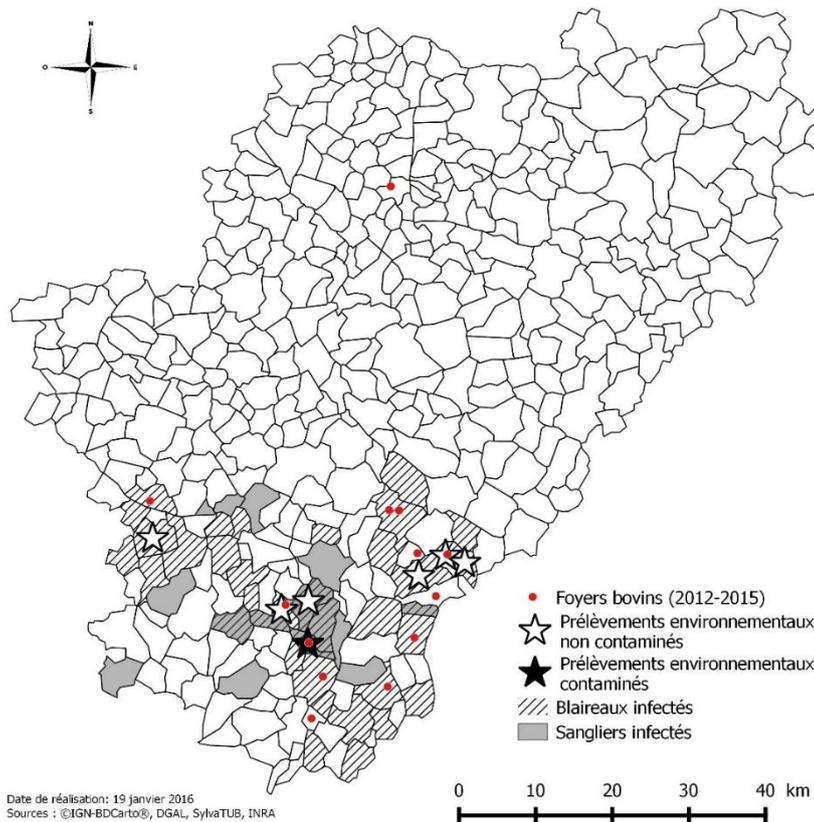


Figure 20 : Localisation des communes de Charente sur lesquelles de foyers bovins et des animaux sauvages infectés ont été détectés et localisation des prélèvements environnementaux effectués en 2015 (les prélèvements positifs sont représentés par des étoiles noires) (Réalisation : Marina Béral, CIREV Bourgogne)

3. Compléments : paysage, géomorphologie et pédologie

La zone endémique Nord de tuberculose bovine en Côte d'Or, que nous avons principalement étudiée, est située sur un territoire appelé l'Auxois, caractérisé par un paysage bocager, ponctué de buttes et de plateaux calcaires où affleure un calcaire dur et karstique. Les pâtures suspectes présentent un contexte paysager, hydrologique et géomorphologique commun. Le parcellaire suspect est localisé dans trois petites vallées parallèles au fond desquelles circule un cours d'eau en direction du Nord-Ouest (Figure 21). Chaque cours d'eau est alimenté par des sources naissant entre les couches calcaires et marneuses du sous-sol dans les pentes. Ces résurgences d'eau proviennent de l'infiltration des précipitations dans les plateaux calcaires, à l'origine du développement d'un réseau karstique drainant d'importants écoulements souterrains et la résurgence d'eau en surface à cause des marnes imperméables du sous-sol. Les pâtures sont situées sur les pentes douces marneuses des buttes ainsi que dans les vallées alluviales humides. Au-dessus des pâtures, un bourrelet boisé marque la rupture

de pente, il présente en général des affleurements plus ou moins importants de calcaire dur (Figure 22). Les pâtures sont majoritairement situées sur la même formation géologique, des marnes du Lias ou du Jurassique inférieur, correspondant à des formations pédologiques particulières, caractérisées par des sols de pentes argilo-limoneux localement hydromorphes (sources et « mouilles »).

Il est intéressant d'observer que les cantons touchés par la tuberculose bovine en Côte d'Or possèdent une densité de bovins allaitant quasi-identique à celle des cantons indemnes localisés dans le sud-ouest du département et limitrophe de la zone d'endémie de bTB (Figure 23). Ces deux groupes de cantons sont localisés sur des formations pédologiques différentes, suggérant que le type de sol des pâtures pourrait être un facteur de risque dans le maintien de la maladie et que la densité des bovins ne semble pas être un facteur majeur dans la distribution des foyers de bTB. L'observation de la distribution du parcellaire des exploitations foyers de tuberculose bovine sur la carte pédologique du département montre que 74 % des parcelles de ces exploitations sont localisées sur cette unité paysagère (sols argilo-limoneux et hydromorphes des pentes: 48 % des parcelles, sols calcaires humides sur alluvions des vallées: 14 % et sols argileux des plateaux calcaires : 12 %) (Figure 24Figure 24).

Une enquête (Etude PatRisk) réalisée dans le cadre d'un Master d'Epidémiologie dans neuf élevages bovins déclarés infectés entre 2010 et 2014 a cherché à identifier les pâtures « à risque » de tuberculose et à les caractériser par des variables concernant les pratiques d'élevage, le voisinage, la faune sauvage et l'environnement (pente, type de sol, relief, exposition, humidité). L'analyse multivariée a mis en évidence deux expositions indicatrices de risque : la pratique du fauchage avant la mise à l'herbe et la présence de zones humides localisées sur la pâture (Bouchez-Zacria, 2015). Ces résultats sont en accord avec le fait que la survie de *M. bovis* est favorisée par la présence d'humidité et qu'une faible hauteur d'herbe augmente la possibilité de contact avec les mycobactéries du sol. Bien que des études plus précises soient recommandées, il semble toutefois que les sols argilo-limoneux hydromorphes des pâtures suspectes constituent un facteur de risque à prendre en compte dans l'épidémiologie de la maladie.

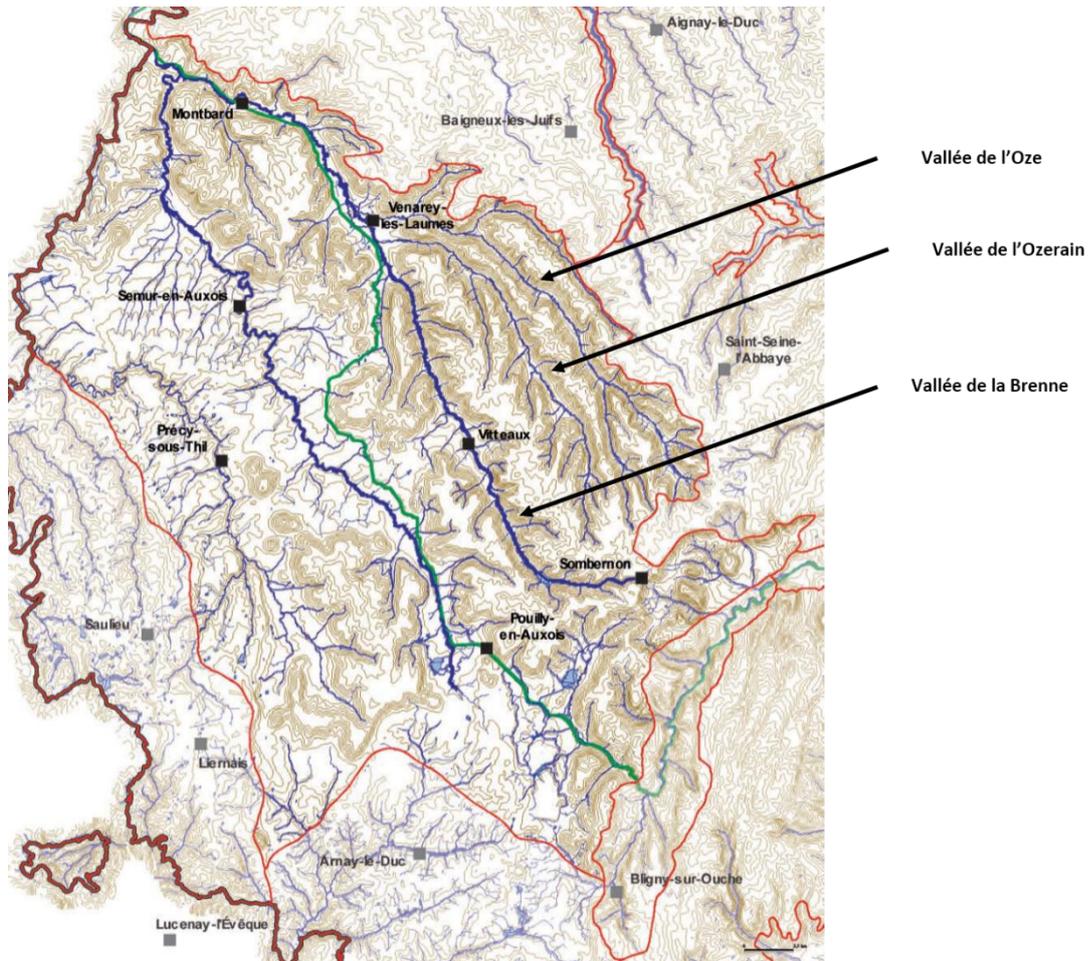


Figure 21 : Orographie et hydrographie de l'Auxois. Les vallées supportant les parcelles suspectes sont indiquées par une flèche noire (Source BD Carthage et BD alti - IGN)

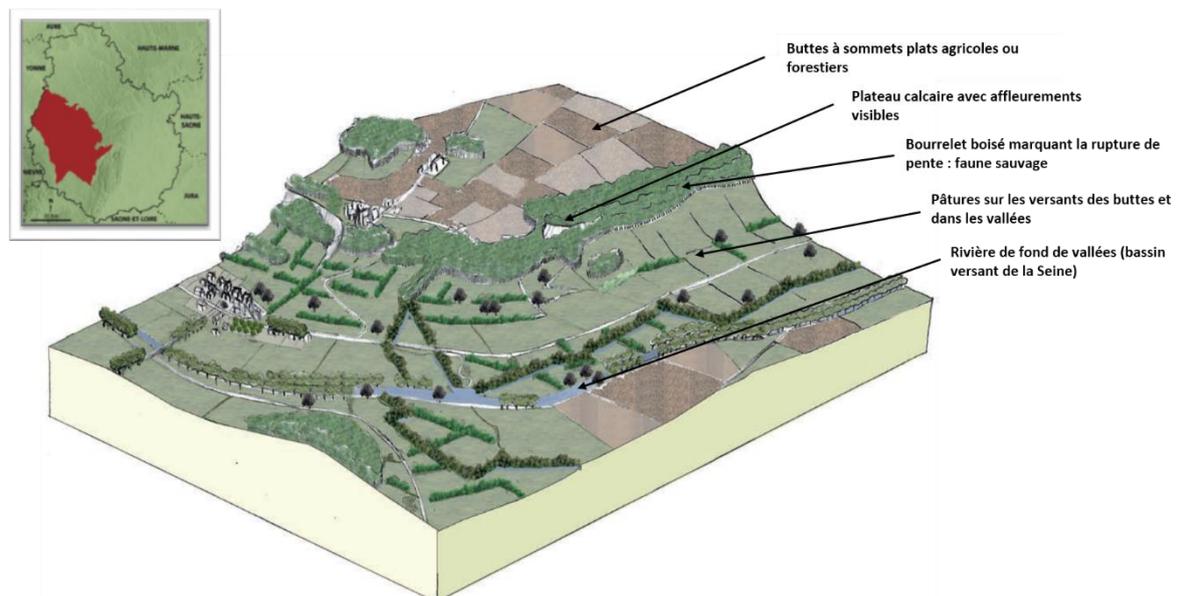


Figure 22 : Localisation de l'Auxois en Côte d'Or, structure paysagère et géomorphologie de ce territoire

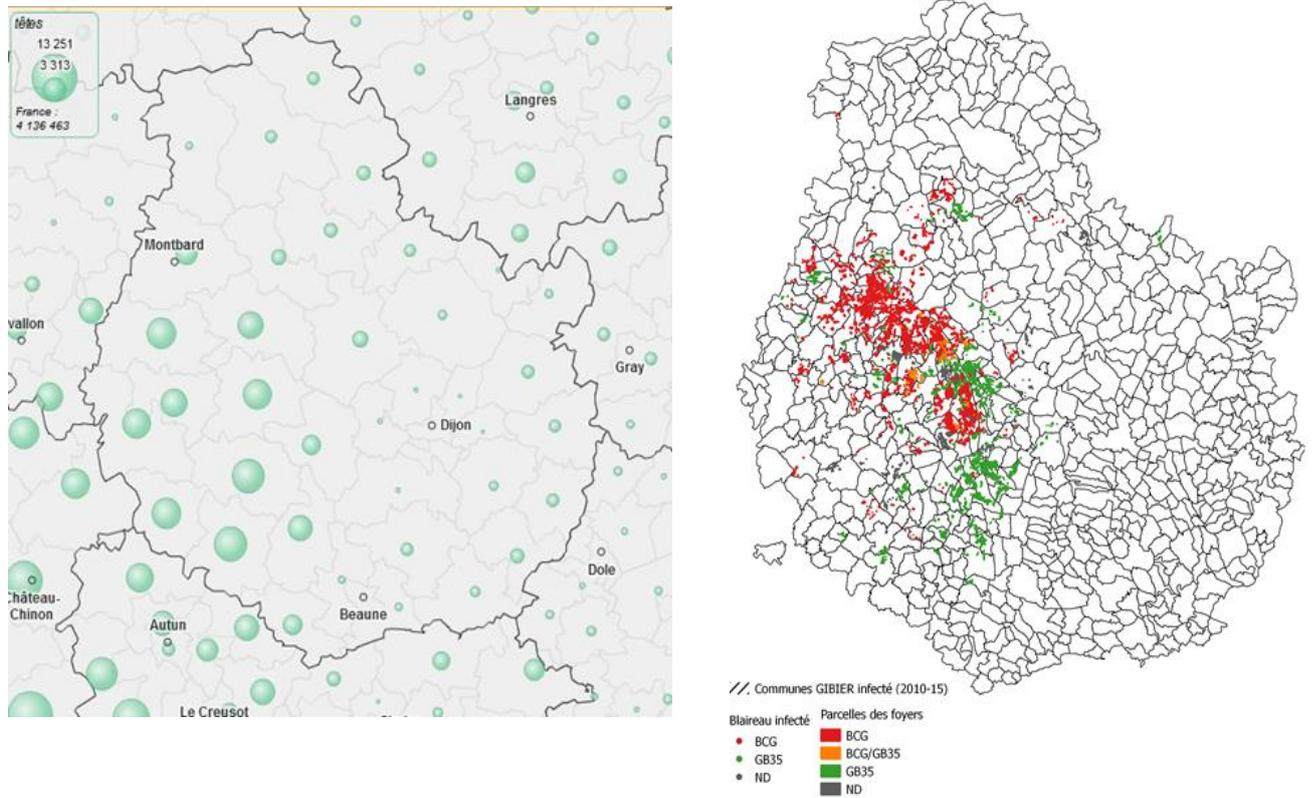


Figure 23 : Nombre de vaches allaitantes par canton dans le département de la Côte d'Or (à gauche) et parcellaire des foyers bovins de 2010 à 2015 (à droite) (Source Recensement agricole 2010 – Agreste)

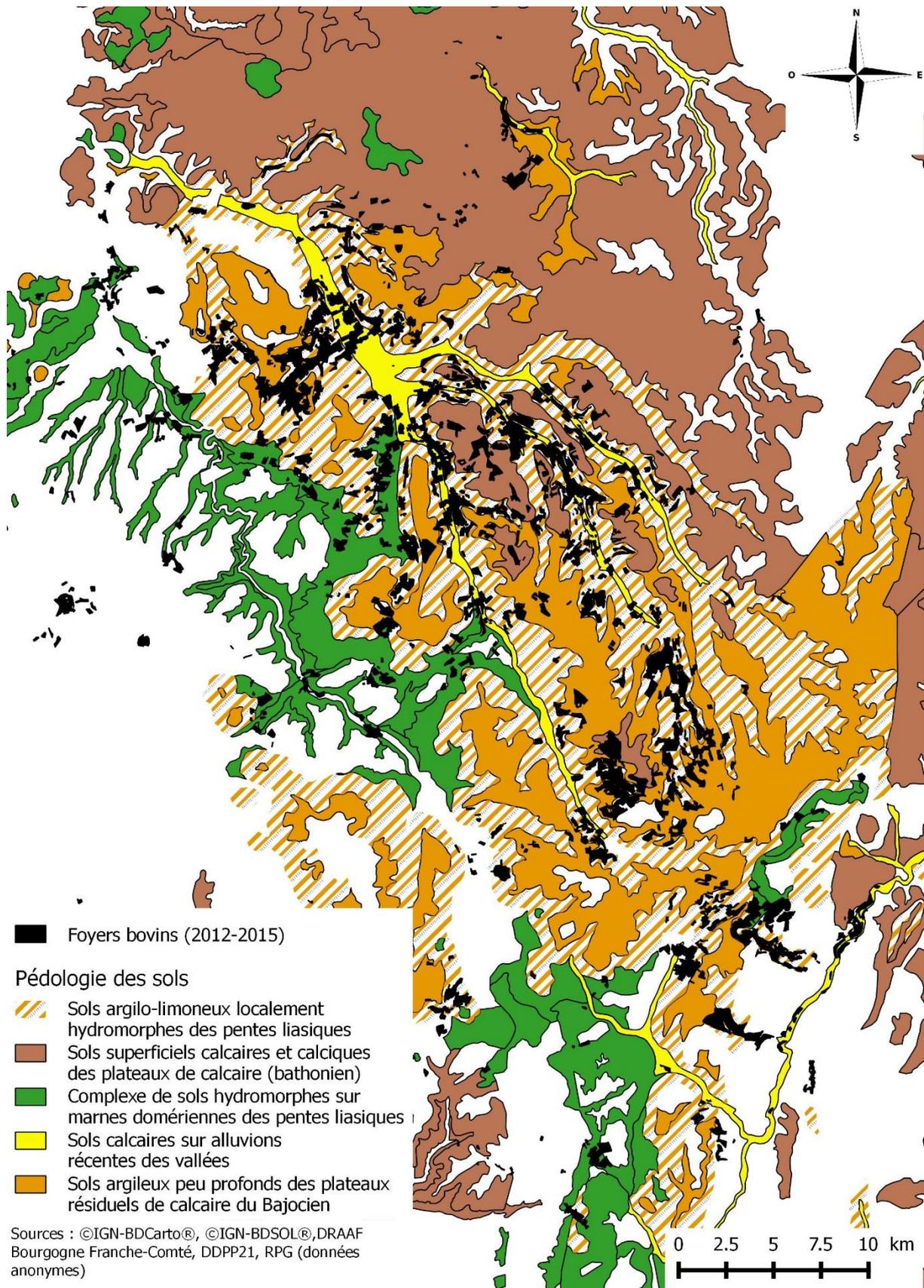


Figure 24 : Répartition spatiale des parcelles des élevages bovins infectés de 2010 à 2014 en Côte d'Or et représentation des couches pédologiques (Réalisation : Marina Béral, CIREV Bourgogne)

D. BILAN GLOBAL

Nous avons développé deux systèmes de détection moléculaire adaptés aux matrices environnementales ciblant les espèces du MTBC (IS1561' et Rv3866) et modifié un système existant spécifique de *M. bovis* (RD4). Nous avons validé ces systèmes sur trois matrices différentes (sol, eau, fèces) inoculées avec *M. bovis* BCG en démontrant leur spécificité, soit pour le MTBC (excluant *M. microti* potentiellement présent dans l'environnement), soit pour *M. bovis*. Leur sensibilité est bonne, puisque les seuils de détection obtenus sont inférieurs aux seuils décrits dans la littérature (en comparant avec une méthode de dénombrement identique à la nôtre). Le système RD4 est à ce jour le seul système de détection spécifique de *M. bovis* dans les échantillons environnementaux, toutefois, d'après notre expérience, il présente une sensibilité moins importante que les deux autres systèmes, malgré des seuils de détection équivalents sur les échantillons inoculés au laboratoire.

La détection du MTBC par l'amplification de l'IS1561' a été effective dans 42 échantillons (sur plus de 400) ; la PCR nichée ciblant la même séquence a mis en évidence 14 échantillons positifs et le système RD4 trois échantillons positifs. Les niveaux de détection varient fortement en fonction des échantillons, l'effet de dilution reste très important dans des matrices comportant des communautés microbiennes abondantes et diversifiées (quantité relative d'ADN cible faible par rapport à des quantités élevées d'ADN non cible). L'utilisation de la PCR quantitative a permis dans certains cas de quantifier les cibles présentes dans les échantillons environnementaux. Les sols de terriers présentent les concentrations en mycobactéries du MTBC les plus élevées pouvant atteindre 4.6×10^4 copies du gène ciblé, ce qui correspond à des quantités de cellules élevées sachant que le nombre de copies du gène cible par génome est de 1.

Parmi les différents sites prélevés, la contamination a été retrouvée exclusivement dans deux écosystèmes particuliers : les zones humides de pâtures (sources et « mouilles ») et les sols de terrier et latrines de blaireaux. La contamination apparaît le plus souvent localisée à une zone géographique et ponctuelle, mais un signal moléculaire positif a été retrouvé pendant un an dans les sols de terriers de blaireaux localisés sur une pâture.

Ces résultats, corrélés au contexte paysager et pédologique des parcelles suspectes, nous ont amené à penser que certaines formations pédologiques seraient plus susceptibles de favoriser la persistance de *M. bovis*. Nous avons donc évalué l'impact de la nature du sol retrouvé dans ces parcelles sur la survie de *M. bovis*. Nous avons également évalué l'impact de la température sur la durée de survie de la bactérie dans le sol.

CHAPITRE 4

Impact de la température et de la nature du sol sur la survie de *Mycobacterium bovis* SB0120

Elodie Barbier, Murielle Rochelet, Laurent Gal, Maria Laura Boschioli, Alain Hartmann

Experimental investigation of the impact of the temperature and the soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment

(Article en cours de soumission)

CHAPITRE 4 - Impact de la température et de la nature du sol sur la survie de *Mycobacterium bovis* SB0120

A. AVANT-PROPOS

La détection moléculaire de *Mycobacterium bovis* dans les écosystèmes agricoles de la zone endémique de Côte d'Or a confirmé que les animaux infectés et excréteurs ont la capacité de contaminer les sols et l'eau accessibles à la faune domestique et sauvage (Chapitre 2). La bactérie ne se multipliant pas dans l'environnement, sa survie dans les substrats environnementaux conditionne la transmission indirecte du bacille entre un animal infecté excréteur et un animal sain par le biais de ces substrats.

Des études expérimentales sur divers substrats environnementaux, notamment du sol, inoculés avec *M. bovis* ou *M. bovis* BCG ont suggéré que les principaux facteurs influençant la survie des bactéries sont les facteurs climatiques, tels que température, humidité et exposition aux UV (Fine et al. 2011; Duffield & Young 1985; Jackson et al. 1995; Young et al. 2005). Bien que quelques études aient recherché par la culture ou par des approches statistiques une éventuelle association de la contamination environnementale ou animale par des mycobactéries avec la nature du sol, les résultats sont difficilement comparables et extrapolables (Walter et al. 2012; Dhand et al. 2009; Reviriego et al. 2000; Johnson-Ifeorunlu & Kaneene 1999; Ward & Perez 2004).

Face à ce manque de connaissances, nous avons donc souhaité évaluer la durée de la survie de *M. bovis* dans deux sols de Côte d'Or présentant des caractéristiques physico-chimiques contrastées et ce à deux températures différentes, afin de rechercher un éventuel impact de la température et de la nature du sol sur la persistance de la bactérie. Pour cette étude, nous avons utilisé une souche pathogène de *M. bovis* (génotype SB0120), ce génotype est retrouvé majoritairement dans la zone Nord chez les bovins et dans la faune sauvage. Deux méthodes de suivi de la population bactérienne ont été utilisées : la culture sur milieu gélosé réalisée à partir de sols irradiés et la qPCR pour le suivi des sols irradiés et biotiques.

B. EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE IMPACT OF THE TEMPERATURE AND THE SOIL TYPE ON *MYCOBACTERIUM BOVIS* SURVIVAL IN THE ENVIRONMENT

Elodie Barbier^{a,b}, Murielle Rochelet^{a,b}, Laurent Gal^{a,c}, Maria Laura Boschioli^d, Alain Hartmann^a

^a INRA, UMR 1347 Agroécologie, Dijon Cedex, France

^b Université de Bourgogne Franche Comté, Dijon Cedex, France

^c AgroSup Dijon, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France

^d Université Paris-Est, Laboratoire National de Référence de la Tuberculose, Unité des Zoonoses Bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, Maisons-Alfort Cedex, France

Key words: *Mycobacterium bovis*; soil; temperature; culture; quantitative PCR

Corresponding Author: Alain Hartmann, UMR 1347 Agroécologie, INRA, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon, Cedex, France. E-mail: alain.hartmann@dijon.inra.fr

INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

Abstract

Mycobacterium bovis, the causative agent of the bovine tuberculosis (bTB), mainly affect cattle, its natural reservoir, but also a wide range of domestic and wild mammals. Besides direct transmission via contaminated aerosols, indirect transmission of the disease between wildlife and livestock is thought to occur by inhalation or ingestion of environmental substrates contaminated by *M. bovis* through infected animal shedding. We monitored the survival of *M. bovis* in two soils chosen for their contrasted physico-chemical properties at two temperatures. The population of *M. bovis* spiked in disinfected soils was enumerated by a culture-based method after 14, 30, 60, 90, 120 and 150 days of incubation at 4°C and 22°C. The fate of *M. bovis* spiked in disinfected or biotic soils was monitored using a qPCR based assay targeting the IS1561' locus. The analysis of survival profiles using culture-based method showed that *M. bovis* survived longer at cooler temperature, but impact of soil characteristics on *M. bovis* persistence was not obvious. Furthermore, qPCR based assay detected *M. bovis* longer than the culture based method with higher gene copy numbers in sterile soils than in biotic ones. Impact of soil type on *M. bovis* persistence need to be further studied in order to shed light on the risk and mechanisms of indirect transmission of the disease.

INTRODUCTION

Mycobacterium bovis is a pathogenic mycobacteria responsible for bovine tuberculosis (bTB). Tuberculosis caused by *M. bovis* is a primarily respiratory disease that may also affect various organs in animals (Morris et al. 1994). Even if bTB mainly concerns cattle, a wide range of domestic and wild mammals may be infected as well (Biet et al. 2005). On the other hand, bTB a zoonotic disease impacting human health (Pérez-Lago et al. 2013). Although cattle is considered as the principal host of *M. bovis*, wild fauna such as badgers (*Meles meles*), wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) has recently been identified as potential wildlife reservoirs (Palmer 2013). Though the transmission of *M. bovis* among cattle usually occurs *via* the inhalation of contaminated aerosols released by infected animals and/or the close contacts (Morris et al. 1994; Phillips et al. 2003), the indirect transmission either by inhalation of environmental bioaerosols or ingestion of infected environmental matrices may be another potential routes of animal infection (Vicente et al. 2007; Palmer et al. 2004; Phillips et al. 2003). Indirect transmission through feed or water has already been demonstrated between deer, deer and cattle (Palmer et al. 2004; Palmer et al. 2001) and badgers and cattle (Little et al. 1982) in laboratory experiments.

Investigating this type of indirect transmission is challenging because it results at least from the combination of three essential factors *i.e.*, i) the environmental contamination by shedding from infected animals, ii) the persistence of the bacteria under a virulent state in environmental matrices and finally iii) the interaction between a new susceptible host with the contaminated matrices. The shedding step by animals has already been demonstrated for many species *via* oro-nasal mucus, sputum, urine, feces and wound discharges, depending on the animal species (Corner et al. 2012; Palmer et al. 2004; Barasona et al. 2015). Secondly, a few previous experimental studies using various environmental substrates spiked with *M. bovis* showed that the bacteria was able to survive for a long time period outside of its host (Williams & Hoy 1930; Duffield & Young 1985; Young et al. 2005; Fine et al. 2011; Ghodbane et al. 2014). For example, using a culture-based method, Ghodbane *et al.* (2014) recovered *M. bovis* bacteria from sterile soils incubated in controlled laboratory conditions 12 months after their inoculation whereas an incubation under the natural weather conditions of Michigan, USA, allowed the persistence of the bacteria in sterile soils for 88 days (Fine et al. 2011). Moreover, several studies have identified several climatic factors such as a cool temperature, an adequate moisture and a protection against solar radiation (ultra violet) as positive factors for the persistence of *M. bovis* in environmental matrices like feces (Williams & Hoy 1930; Tanner & Michel 1999), food supply such as corn, hay, apples (Palmer & Whipple 2006; Fine et al. 2011), water (Little et al. 1982; Fine et al. 2011) and soil (Duffield & Young 1985; Fine et al. 2011) (Duffield & Young 1985; Williams & Hoy 1930; Tanner & Michel 1999; Jackson et al. 1995). When Fine *et al.* (2011) compared the persistence of *M. bovis* in

four substrates (corn, hay, water and soil), the longest survival was found in cool and moist soil (88 days in winter/spring) suggesting that soil probably ensured better conditions of persistence for *M. bovis* than the other matrices tested. Moreover, *M. bovis* was often detected in soils, especially in badger sett soil or in pasture soil (Courtenay et al., 2006; Santos et al., 2015; Sweeney et al., 2007, 2006; Young et al., 2005, Barbier et al., manuscript submitted).

More generally, low pH and high iron content are often described as major factors driving mycobacterial survival in soils, especially for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Johnson-Ifearulundu & Kaneene 1999; Ward & Perez 2004). Concerning *M. bovis*, one statistical study established a relationship between the occurrence of bTB in animals and soil parameters by showing that every a 1 % increase in the sandy content of soil led to an increase in odds of bTB infection by 4 % (Walter et al. 2014), suggesting that soil type may promote or hinder *M. bovis* environmental persistence.

To our knowledge, no comprehensive study focuses on the influence of soil biotic and abiotic parameters on the persistence *M. bovis*. With the aim to further assess the role of the soil characteristics on the persistence of *M. bovis* and thus to better understand the impact of the environment in the epidemiology of the bTB disease, the influence of both the physicochemical characteristics of the soil and the temperature was studied under controlled laboratory conditions. For this purpose, two different soils selected for their contrasted properties were spiked with known concentrations of *M. bovis* and incubated at two different temperatures to mimic seasonal temperatures. The persistence of *M. bovis* over time was monitored using both : a culture-based method for the detection of viable *M. bovis* and a molecular detection method based on a qPCR assay.

MATERIAL AND METHODS

All experiments were conducted in a biosafety level 3 laboratory unless otherwise stated.

***Mycobacterium bovis* cultivation and inoculum preparation**

The strain *Mycobacterium bovis* SB0120 VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6 that infects cattle and wild animals such as badgers and wild boar in France was provided by the National Reference Laboratory of bovine tuberculosis (Maisons-Alfort, France) and grown aerobically at 37°C in Middlebrook 7H9 supplemented with 10 % Middlebrook ADC Growth Supplement (Sigma-Aldrich, France) for thirty days. The *M. bovis* inoculum was prepared as following: a 20 mL stationary phase culture was pelleted and once the supernatant removed the cell aggregates were disrupted by vortexing with glass beads for 15 seconds. The pellet was suspended in 1 mL of sterile water constituting the stock solution and serial 10-fold dilutions were subsequently plated in triplicate onto Middlebrook 7H11 supplemented with 10 % heat inactivated bovine serum (Dominique Dutscher, France) and 10 % Middlebrook OADC

Growth Supplement (Sigma-Aldrich, France) for enumeration. Colonies were counted following incubation for two months at 37°C. The inoculum for the culture-based assay and the qPCR-based assay were respectively prepared by diluting 10-fold and 1000-fold the *M. bovis* stock solution.

Soil characterization and microcosm preparation

Two different soils were collected in two cattle-grazed pastures at 0-30 cm depth in Côte d'Or (a department located in the Middle East of France). The soil A is a clay loamy soil (calciisol) and soil B is a loamy sandy soil. Soils were prepared as following: soil samples were gently air dried and sieved to recover 4 mm aggregates. The moisture contents of soils were determined by drying for 24 h at 105°C and their physico-chemical parameters were determined by the Soil Analysis Laboratory of Arras, France. Fresh sieved soil was used to prepare the microcosms.

Vials of 15 mL (Falcon, Dominique Dutscher, France) were filled with 2 g of the soils A and B. Half of the soil vials were sterilized by gamma-irradiation up to an internal minimum dose of 35 KGray (Ionisos, France). All the microcosm soils (biotic and sterile) were then adjusted to 90 % of the water holding capacity. We verified that neither soil A nor B were positive for *M. bovis* with the culture-based method (sterile soils) and with the qPCR assay (sterile and biotic soils) described later. All the soil microcosms were spiked with 100 µL of the *M. bovis* inoculum 10- or 1000-fold diluted (for sterile and biotic soil, respectively) and stored in the dark in a biosafety level 3 laboratory until their analysis. Sterile spiked soils were incubated at 4°C and 22°C while biotic spiked soils were only incubated at 22°C. Vials were opened in a microbiological safety cabinet every fifteen days to regenerate their atmosphere.

Schedule of microcosm sampling

In order to monitor *M. bovis* cell numbers over time, both plate enumeration and qPCR assay were performed on irradiated soils, while qPCR assay only was carried out for biotic soils. At each sampling date *i.e.* day 0, 14, 30, 60, 90, 120 and 150, three mesocosms of each biotic and sterile soils were analysed with the qPCR assay after DNA extraction/purification and four mesocosms of each sterile soil at each temperature were analysed using culture-based method.

DNA extraction and purification

DNAs from the soil samples were extracted as follows: 8 mL of lysis buffer (100 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl and 2 % (w/v) SDS), 4 g of silica beads (100 µm diameter), 5 g of ceramic beads (1.4 mm diameter) and 8 glass beads (4 mm diameter) were added to each vial of soil. However, as DNA extraction could not be achieved within the biosafety level 3 laboratory for practical reason, soil was suspended in 8 mL of lysis buffer and heated 2 hours at 80°C to kill viable bacteria. The following steps of DNA extraction were then done in a biosafety level 2 laboratory. Samples were

disrupted for 3×30 s at 4 m/s in a FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals Europe, France), incubated for 30 min at 70°C and centrifuged for 5 min at 7000 $\times g$ at room temperature. Supernatants were incubated on ice for 10 min with 1/10 volume of 3 M potassium acetate pH 5.5 and then centrifuged for 5 min. at 14000 $\times g$. One volume of ice-cold isopropanol was added to the supernatant for DNA precipitation overnight at -20°C . DNA was collected by centrifugation (30 min. at 14000 $\times g$), and DNA pellets were washed with ice-cold ethanol (70 %) and dissolved in 100 μL of water. Crude DNA extracts (100 μL) were loaded on Microbiospin™ columns (Biorad, France) filled with 100 mg of polyvinyl polypyrrolidone (PVPP, Sigma Chemical Co, France). After centrifugation (4 min. at 1000 $\times g$, 4 °C), eluted DNA was further purified using the GeneClean Turbo Kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. Purified DNA concentrations were estimated by spectrophotometry ($\lambda = 260$ nm) using a NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, France).

Estimation of DNA quality for PCR amplification

The quality of the purified DNAs extracted from the two soils was assessed by measuring the capacity to amplify a control DNA target in the presence of various dilutions of soil DNA extracts. Briefly, qPCR reactions were done in a final volume of 25 μL containing 2.5 μL of 10^6 copies of the circularized pGEM-T Easy plasmid DNA and 5 μL of water (control) or diluted soil DNA (10- and 20-fold dilutions), 1X Absolute qPCR SYBR Green ROX (500 nM) Mix (Thermo Scientific), 25ng/ μL of T4 bacteriophage gene 32 product. qPCR primers were SP6 (5'–ATTTAGGTGACTATAG-3') and T7 (5'–TAATCGACTCACTATAGGG-3') universal primers (final concentration 500 nM) targeting the polylinker of the plasmid. qPCR and cycling conditions were as following: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles with denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 55°C and elongation at 72°C for 30 s each. The analysis of the melting curves allowed to assess PCR specificity. A tenfold reduction of the copy number amplified by qPCR in the presence of diluted soil DNA with respect to the copy number obtained in the control reaction (water) was considered as 10 % amplification efficiency, or, conversely, as 90 % inhibition of the PCR.

Culture-based method

The sterile soil microcosms were suspended in 9 mL of Middlebrook 7H9 supplemented with ADC by vortexing the vials for 2 min. Tenfold dilutions of soil suspensions were achieved and 100 μL were plated in triplicate onto Middlebrook 7H11 agar enriched as described above and supplemented with antibiotics and antifungal (100 mg.L⁻¹Ticarcillin, 10 mg.L⁻¹ Trimethoprim, 200 000 UI.L⁻¹ Polymyxin B and 100 mg.L⁻¹ Cycloheximid, Sigma-Aldrich, France) for enumeration. Plates were then incubated in gas-permeable bags at 37°C for 2 months and checked every 15 days.

***Mycobacterium tuberculosis* complex quantitative PCR (qPCR)**

Mycobacterium bovis was detected using the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) specific qPCR targeting the IS1561' locus (Forward: 5'- GATCCAGGCCGAGAGAATCTG -3', Reverse: 5'- GGACAAAAGCTTCGCCAAAA - 3' and probe 5' - FAM ACGGCGTTGATCCGATTCCGC TAMRA - 3') as previously described (Barbier et al., manuscript submitted for publication).

qPCR reactions were carried out in triplicate with a 25 µL reaction mix containing 12.5 µL of Absolute™ QPCR ROX Mix (Thermo Scientific, France), 1 µL (final concentration 25 ng.µL⁻¹) of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals Europe, France), 1 µL of each primer (final concentration 400 nmol.L⁻¹), 0.5 µL of each probe (final concentration 200 nmol. L⁻¹), 4 µL of ultrapure water and 5 µL of 20-fold diluted DNA. Absolute quantification was achieved using standard DNA dilutions. A recombinant plasmid containing one copy of the IS1561' fragment of *M. bovis* BCG strain Pasteur 1173P2 cloned in the pCR®II-TOPO® vector (Invitrogen, France) was used as a standard. A calibration curve was obtained by amplification of serial dilutions of the plasmid ranging from 1 to 10⁶ copies per PCR reaction. All DNAs extracted from the soil samples were screened with the IS1561'-based qPCR assay and results were expressed as the number of *M. bovis* gene copy number per g of soil. qPCR assay was performed in a VIIA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, France). Initial denaturation was done at 95°C for 15 min, followed by forty-five cycles with denaturation at 95°C for 15 s, annealing and elongation at 60°C for 1 min. Detection limits of this molecular system was previously determined in soil (Barbier et al., manuscript submitted for publication).

RESULTS

Physico-chemical characteristics of soils A and B

The physico-chemical characteristics of soils A and B are summarized in Table 1. The soil A is a clay loamy soil with a slightly basic pH (7.75) and a high content of clay (clay account for 39.7 % in particle-size distribution and sand for only 11.8 %) while the soil B is a loamy sandy soil with an acidic pH (5.46) and a high content of sand (sand account for 34.5 % in particle-size distribution and clay for only 19.2 %). Silt content was roughly equivalent in the two soils (485 g kg⁻¹ for soil A vs 463 g kg⁻¹ for soil B). We chose to adjust soil moisture to 90 % of their water field holding capacity leading to a moisture content of 31 % for soil A and 21 % for soil B. Finally, the C-to-N ratio was 9.5 for soil A and 10.9 for soil B.

Table 1 : Physico-chemical parameters of soils A and B

Physical parameters	Soil A	Soil B	Unit
Clay (< 2 µm)	397	192	g kg ⁻¹
Silt	485	463	g kg ⁻¹
Sand	118	345	g kg ⁻¹
Water field capacity	352	247	g kg ⁻¹
Chemical parameters			
pH	7.75	5.46	-
Total C	36.1	29.2	g kg ⁻¹
Total N	3.8	2.69	g kg ⁻¹
C- to N- ratio	9.5	10.9	-
Organic matter	62.5	50.6	g kg ⁻¹
P	0.031	0.025	g kg ⁻¹
K	0.158	0.0877	g kg ⁻¹
Ca	7.17	1.1	g kg ⁻¹
Na	0.0115	0.0129	g kg ⁻¹
Mg	0.0541	0.0789	g kg ⁻¹
Fe	0.526	0.227	g kg ⁻¹
CEC ^a	18.3	10.8	cmol+.kg ^{-1b}

^aCEC: Cation Exchange Capacity

^bcmol+.kg⁻¹: centimoles of positive cations per kg of soil

Effect of temperature and soil type on *M. bovis* survival time measured by culture-based method

Theoretical detection limit of our culture-based method was estimated at 1.5×10^3 CFU g⁻¹ soil. Total cultivable *M. bovis* (CFU g⁻¹ soil) were enumerated by the culture-based method described above for each sterile soil incubated at 4°C and 22°C at day 0, 14, 30, 60, 90, 120 and 150. At day 0, number of *M. bovis* was estimated at $1.5 (\pm 0.6) \times 10^7$ CFU g⁻¹ for soil A and $1.7 (\pm 0.7) \times 10^7$ CFU g⁻¹ for soil B by the culture-based method.

Two different patterns of mycobacterial survival were observed depending on the temperature, (Figure 1a and 1b). At 22°C, *M. bovis* cells decreased over the course of the experiment in the two sterile soils A and B (Figure 1a). No more cultivable bacteria growth was observed from day 90 in soil B and day 120 in soil A to the end of the experiment at day 150. Although *M. bovis* SB0120 was detected by culture for one month longer in soil A than in soil B, no statistically significant difference of CFU numbers was observed between the two soils at 22°C (Student-Newman-Keuls Test, $p = 0.559$), thus no significant difference in *M. bovis* survival was observed due to soil type.

At 4°C, *M. bovis* cultivable cells were recovered in high concentrations in the two soils at every sampling date (over the five months of the experiment). The *M. bovis* CFU numbers remained stable during the first 30 days in the two soils as indicated in Figure 1b. We observed a slight decrease of the

CFU numbers in the two soils starting from day 60 to the end of the study. In both soils, *M. bovis* CFU numbers decreased significantly from day 0 to day 150 (Student-Newman-Keuls Test, $p < 0,001$), reaching $8.7 (\pm 2.5) \times 10^5$ CFU g^{-1} and $2.2 (\pm 1.1) \times 10^5$ CFU g^{-1} in soil A and B respectively.

Effect of soil type and endogenous microbiota on *M. bovis* survival time measured by qPCR assay

Survival of *M. bovis* when biotic or sterile soils A and B were incubated at 22°C was monitored using the qPCR based assay. The *M. bovis* gene copy numbers were estimated with IS1561'qPCR-based method for each sterile and biotic soils incubated at 22°C at day 0, 14, 30, 60, 90, 120 and 150 (see Figure 2). At day 0, number of *M. bovis* gene copies per g of soil yielded $3.6 (\pm 1.2) \times 10^5$ and $6.0 (\pm 1.9) \times 10^5$ respectively for sterile soils A and B and $1.2 (\pm 0.7) \times 10^5$ and $2.5 (\pm 1.5) \times 10^5$ respectively for biotic soils A and B by the qPCR-based method.

Overall, high amounts of *M. bovis* gene copies were detected in the four soils at the eight sampling dates

A statistically significant interaction between time and soil condition (biotic vs sterile) was observed when considering the two soils independently and dependently (Student-Newman-Keuls Test, $p < 0,001$) with higher amounts of gene copies recovered in sterile soils than in biotic ones from day 0 to day 150. No significant differences were observed when comparing the gene copy numbers in the two sterile soils or in the two biotic soils at each sampling date.

Even though the *M. bovis* gene copy numbers slightly oscillated in the four soils over the course of the experiment, a slight but significant decrease of these numbers was observed between day 0 and day 150 for each soil. The highest decreases of *M. bovis* were observed in the biotic soils with a rough loss of 1 log for soil B and 0.75 log for soil A between day 0 and day 150 (Figure 2).

Finally, qPCR assay allowed a longer *M. bovis* detection in sterile soils A and B incubated at 22°C than culture-based assay. Indeed, *M. bovis* DNA was detected by qPCR for up to 150 days in the two sterile soil samples, while bacterial culture detected viable *M. bovis* cells up to 60 days in soil D and 90 days in soil C.

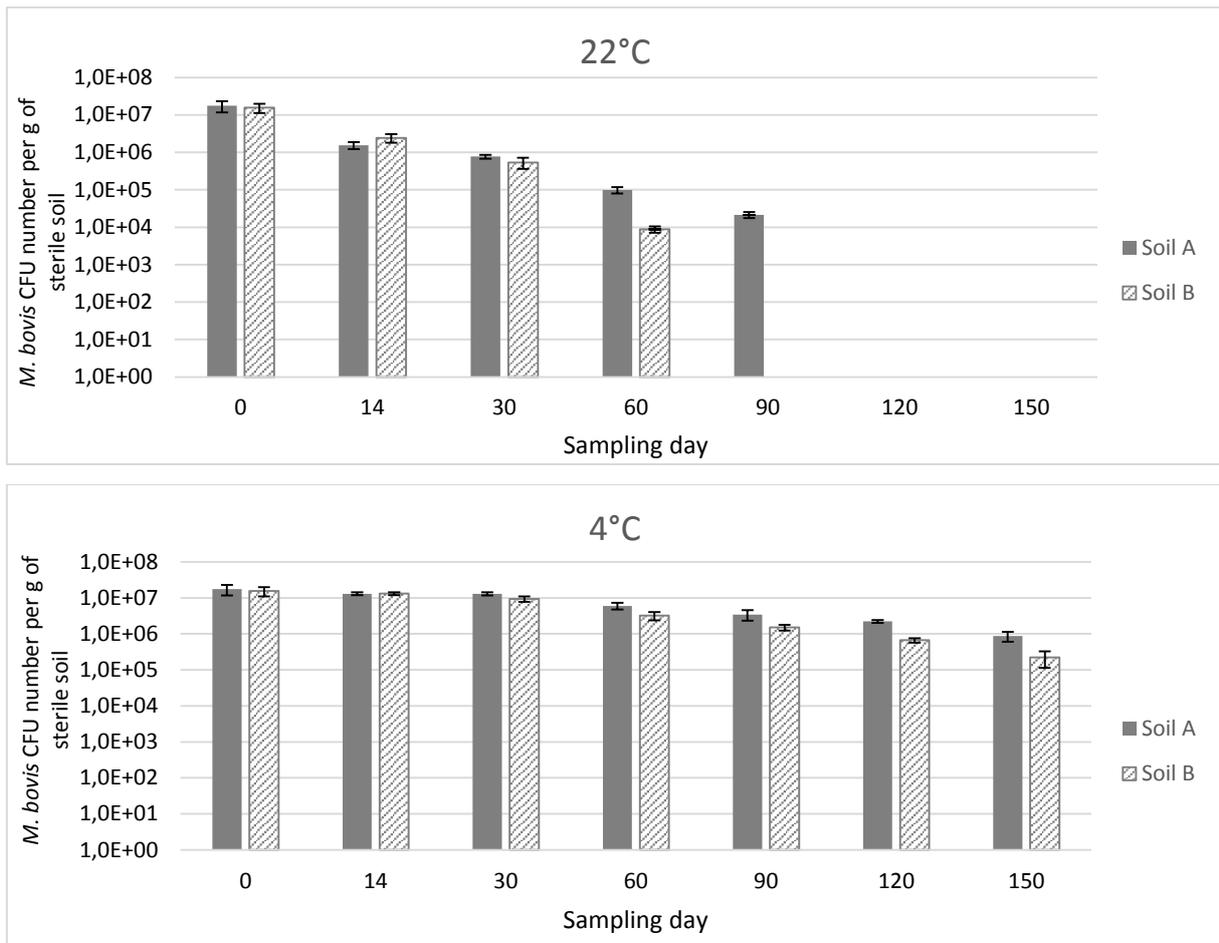


Figure 1: Detection of *M. bovis* SB0120 by culture-based method in sterile soils A and B after incubation at 22°C (figure above) and 4°C (figure below). Error bars represent the standard deviation values on 8 replicates.

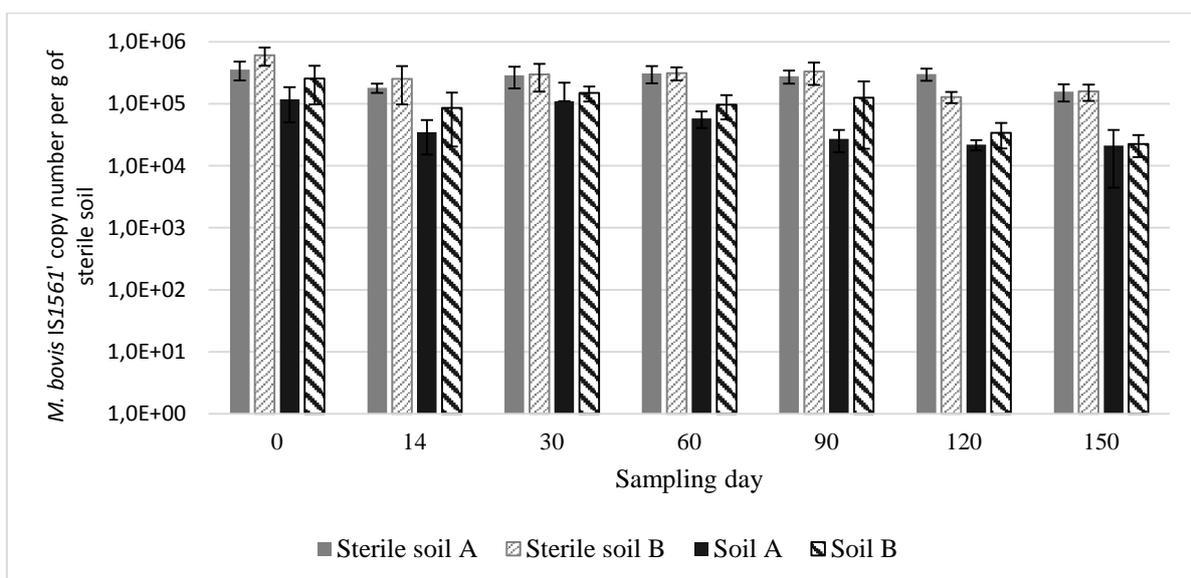


Figure 2: Detection of *M. bovis* gene copy numbers by IS1561' qPCR-based assay on sterile and biotic soils A and B after incubation at 22°C. Error bars represent standard deviation values on 9 replicates.

DISCUSSION

Contamination of the environment with *M. bovis* is considered as essential for the persistence of bovine tuberculosis in animals and its interspecific indirect transmission. The survival of this mycobacteria in soil has been documented (Duffield & Young 1985; Jackson et al. 1995; Fine et al. 2011; Young et al. 2005) but limited information is available on the soils used and the edaphic factors that may affect *M. bovis* persistence are poorly understood. These experiments have dealt with controlled or environmental parameters that promote or hinder *M. bovis* persistence in soil such as temperature, moisture or UV exposition, but to our knowledge, impact of the soil type has not been thoroughly addressed. This study was designed to evaluate temperature and soil type impact on *M. bovis* survival.

In this study, we demonstrated that *M. bovis* SB0120 may survive several months in soil under different laboratory conditions in two contrasted soils and that cool temperature (4°C) strongly promotes *M. bovis* persistence whatever the soil type while warmer temperature (22°C) shortens its survival time. Our results are in contradiction with a previous laboratory study on *M. bovis* persistence (Young et al. 2005), where mycobacterial survival was longer at 25°C than at 4°C in a sterile sandy soil (pH 6.5-6.8, 60 days vs 16 days), but in agreement with previous field studies where lower temperature increased *M. bovis* survival time up to 88 days (Fine et al. 2011; Jackson et al. 1995).

We also pointed out that soil type may impact on *M. bovis* survival time. Indeed, despite that no statistical difference was observed, the soil A that exhibits high clay and loam content and slightly basic pH allowed persistence of cultivable *M. bovis* for up to three months (90 days) while this persistence was only two months in the acidic sandy loamy soil B, when soils were incubated at 22°C. On the contrary, a difference of *M. bovis* survival was observed at 4°C between the two soils, with a better survival in soil A than in soil B, suggesting an impact of soil type on *M. bovis* survival at cool temperature. However, we were hampered by the detection limit of the culture-based method in the experiment on sterile soil at 22°C, where CFU numbers and detection limit overlapped after day 60. Enrichment broth are very useful to recover low number of bacteria in complex matrices, such as *Salmonella typhimurium* in food or *Listeria monocytogenes* in soil (Locatelli et al. 2013; Zheng et al. 2013), but mycobacterial enrichment broths are not yet available for mycobacteria.

In our study, clay soil with slightly basic pH seemed to promote *M. bovis* SB0120 survival, although mycobacterial culture, detection or persistence are usually associated with sandy soils harbouring acidic pH as previously suggested by positive culture or statistical studies (Walter et al. 2014; Johnson-Ifeorlundu & Kaneene 1999; Reviriego et al. 2000; Santos et al. 2015), suggesting an improved survival of the mycobacteria such as *M. avium* ssp. *paratuberculosis* and *M. bovis* in these soils. However, a one year persistence of cultivable *M. bovis* was demonstrated in a sandy soil with a basic pH (8.3) spiked with 10^8 CFU g⁻¹ (Ghodbane et al. 2014), suggesting that *M. bovis* may survive a

long time in soils harbouring a wide range of pH. Moreover, iron content of soils A and B seemed to be significantly higher than soils described in previous studies

In this study, qPCR was able to detect the presence of *M. bovis* DNA over a longer period of time than bacterial culture in soils samples incubated at 22°C, whatever the soil type. As one previous study reported that DNA of dead *M. bovis* cells was no more amplified 10 days after cell death (Young et al. 2005), we hypothesized that our qPCR assay detected live *M. bovis* up to 150 days after inoculation of soils. Viable *M. bovis* cells have already been detected in sterile and biotic soil over a 15 month period targeting the 16S rRNA encoding gene (Young et al. 2005). Physiological state of pathogenic mycobacteria such as *M. bovis* in soil is unknown but dormancy or a viable but non cultivable state (VBNC) have been suggested to explain their survival in environmental matrices (Whittington et al. 2004; Adams et al. 2013). Further analysis of the expression of dormancy-related genes (Álvarez et al. 2009) under soil conditions might allow to support this hypothesis. Further researches are critical to ascertain the long bacterial survival in soil and to understand the genetic mechanisms involved in soil persistence.

Our laboratory conditions were far from field conditions where temperature fluctuations, moisture variations and UV radiation are detrimental to the mycobacteria. *Mycobacterium bovis* survival time obtained in this study is probably longer than survival time in environmental conditions. As the gap of knowledge is important about how *M. bovis* survive in soils, laboratory studies have to be set out in order to determine the main factors involved in *M. bovis* survival. However, experiments dealing with the exposition of *M. bovis* naturally or artificially contaminated samples to environmental conditions must be carried out in specific open air enclosure with high levels of protection to exclude mycobacterial dissemination (Fine et al. 2011) or require climate chambers with a L3 biosafety level.

Significant differences in the recovery of *M. bovis* DNA between biotic and sterile soils were observed with the qPCR-based assay from the first day of the experiment, indicating that qPCR detection is hampered when soil metagenomic DNA is concentrated, although no inhibition was observed.

In our experiment, the use two soils gave an insight on the impact of soil type on *M. bovis* survival. However, extensive studies on larger number of well-characterised and contrasted soils would be required to target the key edaphic factors that promote *M. bovis* survival in soil. Further work is needed to identify those key factors and determine if the population detected with qPCR consists of non-culturable or dormant cells capable of resuscitation under specific growth conditions or following inhalation or ingestion by animals.

Funding information

The work was supported by the Regional Council of Burgundy (Elodie Barbier PhD fellowship), the Côte d'Or General Council, Interbev and the Côte d'Or GDS (Groupement de Défense Sanitaire: Livestock health protection group). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare

Acknowledgements

The authors would like to thank Jean-Marie Duez, Julien Bador and Catherine Neuwirth from the Plateau Technique de Biologie of the Hospital of Dijon.

REFERENCES

- Adams, A.P. et al., 2013. Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(20), pp.6501–6506.
- Álvarez, A.H., Estrada-Chávez, C. & Flores-Valdez, M.A., 2009. Molecular findings and approaches spotlighting *Mycobacterium bovis* persistence in cattle. *Veterinary Research*, 40(3), pp.1–16.
- Barasona, J.A. et al., 2015. DNA detection reveals *Mycobacterium tuberculosis* complex shedding routes in its wildlife reservoir the Eurasian wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, (DECEMBER).
- Biet, F. et al., 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, 36, pp.411–436.
- Corner, L.A.L. et al., 2012. The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 194(2), pp.166–72.
- Courtenay, O. et al., 2006. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biology letters*, 2(3), pp.460–2..
- Dhand, N.K. et al., 2009. Association of farm soil characteristics with ovine Johne's disease in Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 89, pp.110–120.
- Duffield, B.J. & Young, D.A., 1985. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Veterinary Microbiology*, 10, pp.193–197.
- Fine, A.E. et al., 2011. A study of the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural weather conditions in Michigan, USA. *Veterinary medicine international*, 2011, p.765430.

- Ghodbane, R. et al., 2014. Long-term survival of *tuberculosis* complex mycobacteria in soil. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 3), pp.496–501..
- Jackson, R., De Lisle, G.W. & Morris, R.S., 1995. A study of the environmental survival of *Mycobacterium bovis* on a farm in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 43(7), pp.346–352..
- Johnson-Ifeorulundu, Y. & Kaneene, J.B., 1999. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *American journal of veterinary research*, 60(5), pp.589–96..
- Little, T.W., Naylor, P.F. & Wilesmith, J.W., 1982. Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. *The Veterinary record*, 111(24), pp.550–7..
- Locatelli, A. et al., 2013. Nation-wide study of the occurrence of *Listeria monocytogenes* in French soils using culture-based and molecular detection methods. *Journal of microbiological methods*, 93(3), pp.242–50..
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U. & Jackson, R., 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary microbiology*, 40(1-2), pp.153–77..
- Palmer, M. V, 2013. *Mycobacterium bovis*: Characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(SUPPL1), pp.1–13.
- Palmer, M. V, Waters, W.R. & Whipple, D.L., 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *American Journal of Veterinary Research*, 65(11), pp.1483–1489.
- Palmer, M. V & Whipple, D.L., 2006. Survival of *Mycobacterium bovis* on feedstuffs commonly used as supplemental feed for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of wildlife diseases*, 42(4), pp.853–8..
- Palmer, M. V, Whipple, D.L. & Waters, W.R., 2001. Experimental deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *American journal of veterinary research*, 62(5), pp.692–6.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y. & García-de-Viedma, D., 2013. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Research in Veterinary Science*, 97, pp.S94–S100..
- Phillips, C.J.C. et al., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in veterinary science*, 74(1), pp.1–15..
- Reviriego, F.J., Moreno, M. a. & Domínguez, L., 2000. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 43, pp.43–51.
- Santos, N. et al., 2015. Widespread environmental contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex revealed by a molecular detection protocol. *Plos One*, 10(11), p.e0142079..
- Sweeney, F.P. et al., 2007. Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by real-time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), pp.7471–3..

- Sweeney, F.P. et al., 2006. Immunomagnetic recovery of *Mycobacterium bovis* from naturally infected environmental samples. *Letters in applied microbiology*, 43(4), pp.364–9..
- Tanner, M. & Michel, A.L., 1999. Investigation of the viability of *M. bovis* under different environmental conditions in the Kruger National Park. *Journal of Veterinary Research*, (66), pp.185–190.
- Vicente, J. et al., 2007. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Veterinary Research*, 38(3), pp.451–464.
- Walter, W.D. et al., 2014. Linking bovine tuberculosis on cattle farms to white-tailed deer and environmental variables using Bayesian hierarchical analysis. *PLoS one*, 9(3), p.e90925..
- Walter, W.D. et al., 2012. On-farm mitigation of transmission of tuberculosis from white-tailed deer to cattle: literature review and recommendations. *Veterinary medicine international*, 2012, p.616318..
- Ward, M.P. & Perez, A.M., 2004. Association between soil type and paratuberculosis in cattle herds. *American Journal of Veterinary Research*, 65(1), pp.10–14..
- Whittington, R. et al., 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), pp.2989–3004..
- Williams, R.S. & Hoy, W.A., 1930. The viability of *B. tuberculosis (bovinus)* on pasture land, in stored faeces and in liquid manure. *The Journal of hygiene*, 30(4), pp.413–419.
- Young, J.S., Gormley, E. & Wellington, E.M.H., 2005. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), pp.1946–1952.
- Zheng, Q. et al., 2013. Comparison of enrichment broths for the recovery of healthy and heat-injured *Salmonella typhimurium* on raw duck wings. *Journal of food protection*, 76(11), pp.1963–8.

C. BILAN

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent la capacité de *M. bovis* SB0120 à survivre plusieurs mois dans les deux sols de Côte d'Or sous une forme viable, cette durée étant impactée par un facteur abiotique particulier : la température. Une survie d'au moins cinq mois est observée à basse température (4°C) dans les deux sols avec une très faible diminution de la population bactérienne initialement inoculée, alors qu'elle n'est que de deux à trois mois à 22°C. Bien que *M. bovis* soit cultivée un mois de plus dans le sol C par rapport au sol D, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la nature du sol sur la survie de la bactérie à 22°C. Toutefois, à cause de contraintes techniques, notre analyse n'a porté que sur deux sols limitant fortement l'interprétation des résultats. L'analyse des sols inoculés et incubés à 22°C par qPCR montre un tout autre profil de survie, puisque *M. bovis* est détectée en quantité importante pendant les cinq mois de l'étude sur les deux sols et les deux conditions (biotique vs stérile).

Les résultats divergents obtenus par la culture et la qPCR sur les sols incubés à 22°C amènent à faire différentes hypothèses pour expliquer l'absence de croissance des bactéries, puisque la qPCR détecte l'ADN des cellules vivantes et mortes ainsi que l'ADN libre. Nous pouvons donc envisager que l'ADN détecté entre 60 et 150 jours appartienne à des cellules viables non cultivables ou à des cellules mortes entières ou lysées. Des études complémentaires sont indispensables pour préciser l'état physiologique des bactéries devenues incultivables après une incubation dans le sol.

En extrapolant les résultats obtenus aux conditions de température rencontrées en Côte d'Or, nous pouvons suggérer une fenêtre temporelle pendant laquelle la survie de *M. bovis* dans le sol est maximale. La Figure 25 représente les températures minimales et maximales relevées à Dijon entre janvier 2012 et décembre 2015. Nous estimons que les températures rencontrées dans l'Auxois sont probablement plus proches des températures minimales observées dans la plaine de Dijon-Longvic où se trouve la station météo (anthropisation minimale, altitude, humidité, végétation) que des maximales. Ainsi la période la plus à risque va de novembre à avril (températures minimales de l'air < 5°C) et correspond à la fin de l'automne, l'hiver et le début du printemps. Durant le reste de l'année, et en particulier en été (températures maximales de l'air > 22°C) les risques de survie de *M. bovis* semblent moins importants. Ces conclusions restent des hypothèses dans la mesure où la température réelle des sols n'a pas été mesurée et la variation des autres facteurs climatiques n'a pas été prise en compte. Cependant on peut penser qu'en été (sous forte insolation) la température des sols peut augmenter rapidement dans les quelques premiers centimètres de sol, limitant la durée de survie de la bactérie.

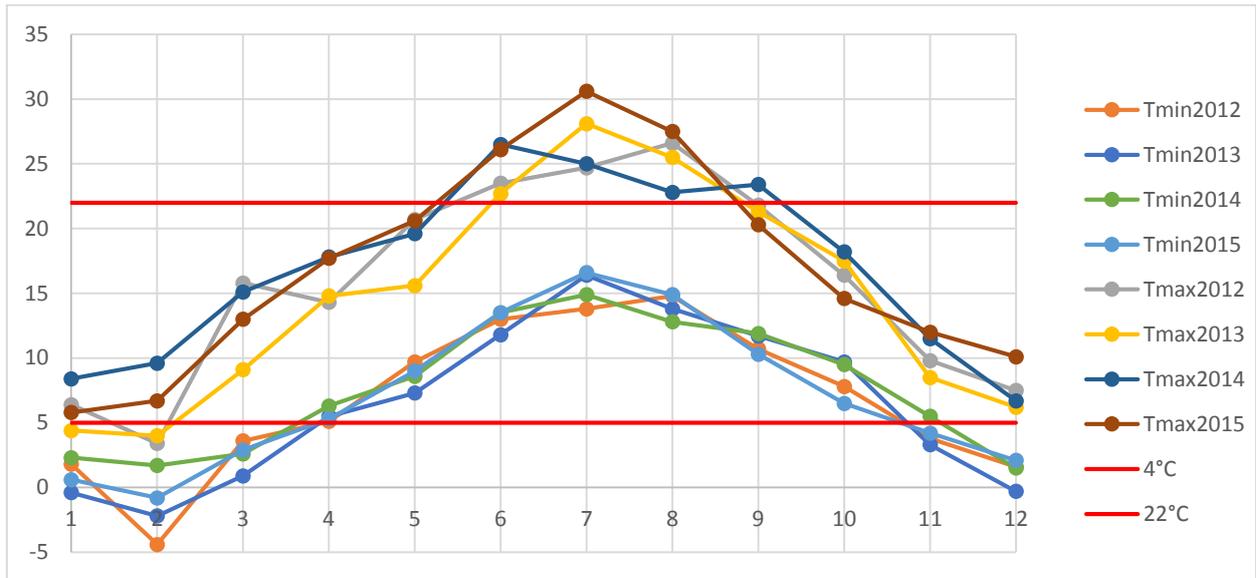


Figure 25 : Températures minimales et maximales observées à Dijon-Longvic de 2012 à 2015 (Source Météo France)

CHAPITRE 5

Rôle de la faune du sol dans la circulation de *Mycobacterium bovis* : étude de la dissémination de *M. bovis* par les lombrics

E. Barbier, B. Chantemesse, M. Rochelet, L. Fayolle, L. Bollache, M. L. Boschioli, A. Hartmann.
**Rapid dissemination of *Mycobacterium bovis* from cattle dung to soil by the earthworm
*Lumbricus terrestris***

(Article accepté, en cours de publication, Veterinary Microbiology)

CHAPITRE 5 - Rôle de la faune du sol dans la circulation de *Mycobacterium bovis* : étude de sa dissémination par les lombrics

A. AVANT-PROPOS

Le rôle de la faune et de la microfaune du sol dans la survie et la dissémination de *Mycobacterium bovis* dans l'environnement est inconnu aujourd'hui. Comme nous l'avons évoqué dans la synthèse bibliographique, les protozoaires, plus particulièrement les amibes, jouent un rôle vraisemblable dans la survie des mycobactéries environnementales (Adekambi et al. 2006; Mba Medie et al. 2011; Mura & Bull 2006), voire dans la virulence des mycobactéries opportunistes (Cirillo et al. 1997). *In vitro*, la survie intra-amibienne de *M. bovis* pendant plusieurs mois a été démontrée, mais aucune étude de terrain évaluant le rôle potentiel des amibes comme réservoir de *M. bovis* n'est disponible. Concernant la mésofaune, les lombrics ont été identifiés comme vecteur potentiel dans la transmission de *M. avium* ssp. *paratuberculosis* dans des élevages bovins et caprins infectés (Fischer et al. 2003). Véritables ingénieurs du sol, ces animaux ont un rôle important dans la circulation des microorganismes, en les transférant et les sélectionnant depuis la matière organique qu'ils ingèrent et dont ils sont de gros consommateurs, vers le sol qui les entoure par le biais de leurs turricules.

Afin d'évaluer le rôle potentiel des lombrics dans la dissémination de *M. bovis* dans le sol suite à l'ingestion de matières fécales animales contaminées, nous avons étudié le transfert de *M. bovis* BCG depuis les fèces inoculés vers le sol environnant par une espèce de lombric anécique, *Lumbricus terrestris*. La population bactérienne de *M. bovis* a été détectée et quantifiée par qPCR dans le sol environnant, les turricules et le tube digestif des lombrics.

B. RAPID DISSEMINATION OF *M. BOVIS* FROM CATTLE DUNG TO SOIL BY THE EARTHWORM *LUMBRICUS TERRESTRIS*

Elodie Barbier^{a,b}, Benoit Chantemesse^{a,b}, Murielle Rochelet^{a,b}, Léon Fayolle^a, Loïc Bollache^{b,c}, Maria Laura Boschioli^d, Alain Hartmann^a

^a INRA, UMR 1347 Agroécologie, Dijon Cedex, France

^b Université de Bourgogne Franche Comté, Dijon Cedex, France

^c Laboratoire Chrono-environnement, UMR CNRS 6249 Besançon, France

^d Université Paris-Est, Laboratoire National de Référence de la Tuberculose, Unité de Zoonoses Bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, Maisons-Alfort Cedex, France

Key words: *Mycobacterium bovis*; spreading; earthworms; *Lumbricus terrestris*; cattle; soil; quantitative PCR

Running title: Environmental dissemination of *Mycobacterium bovis* by earthworms

Corresponding Author: Alain Hartmann, UMR 1347 Agroécologie, INRA, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon, Cedex, France. E-mail: alain.hartmann@dijon.inra.fr

Abstract

Indirect transmission of the bovine tuberculosis (bTB) between wildlife and livestock is thought to occur by inhalation or ingestion of environmental substrates contaminated through animal shedding. The role of the soil fauna, such as earthworms, in the circulation of *Mycobacterium bovis* from contaminated animal feces is of interest in the epidemiology of bTB. The objective of this study was to assess the impact of earthworm activity on *M. bovis* transfer from animal dung to castings and the surrounding soil. For this purpose, microcosms of soil containing the anecic earthworms *Lumbricus terrestris* were prepared and covered with cattle feces spiked with the *M. bovis* BCG strain Pasteur to carry out two separate experiments. The dissemination, the gut carriage and the excretion of *M. bovis* were all monitored using a specific qPCR-based assay. Our results showed that the earthworm *L. terrestris* was able to rapidly disseminate *M. bovis* from the contaminated cattle feces to the surrounding soil through casting egestion. Moreover, contaminated earthworms were shown to shed the bacteria for 4 days when transferred in a bTB-free soil. This study highlights for the first time the possible role of earthworms in the dissemination and the persistence of *M. bovis* in soils in bTB endemic areas.

INTRODUCTION

Mycobacterium bovis is a pathogenic mycobacteria that can infect and cause bovine tuberculosis (bTB) in cattle and in a wide range of domestic or wild mammals, as well as in humans (Biet et al., 2005). bTB is a primarily respiratory disease, but it may affect various organs in animals (Morris et al., 1994). Although cattle are considered as the principal host of *M. bovis*, wild fauna such as badgers (*Meles meles*), wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) has also been identified as potential wildlife reservoirs (Palmer, 2013). Transmission of bTB between cattle mainly occurs by inhalation of contaminated aerosols during close contacts with infected animals (Morris et al., 1994; Phillips et al., 2003). An inoculum of less than ten bacilli is enough to cause respiratory disease in cattle (Dean et al., 2005). Moreover, indirect transmission by inhalation of environmental bioaerosols or ingestion of infected soil and water could also be a potential way of animal contamination (Palmer et al., 2004; Vicente et al., 2007).

Infected animals were shown to shed *M. bovis* via oro-nasal mucus, sputum, urine, feces and wound discharges (Corner et al., 2012; Palmer et al., 2004) that may contaminate environment, especially pastures shared by cattle and wild animals. Thus, investigation of soil as a potential reservoir of *M. bovis* is an important step towards understanding the epidemiology of the bacteria. To reach this goal, deciphering the ecological factors that govern the survival and the spread of *M. bovis* is first required.

Among soil fauna, earthworms constitute the largest animal biomass in most terrestrial ecosystems, especially in grasslands (Lavelle and Spain, 2001). Earthworms play a role of engineers in soil processes, impacting on soil functions and ecosystem services (Blouin et al., 2013), affecting soil structure, water movement, organic matter decomposition, nutrients releasing, plant growth and pollution remediation. Earthworms are usually classified in three ecological types according to their feeding habits: i) the epigeic ones are restricted to the surface organic layers where they feed themselves, ii) the endogeic ones live in the subsurface where they burrow lateral tunnels to ingest soil and organic matter and iii) the anecic ones feed preferentially on surface litter but live in burrows in the soil (Lee, 1985). Earthworms ingest soil particles mixed with organic matter that are mechanically and chemically digested by both gut fluid and microbiota (Curry and Schmidt, 2007) and release castings (undigested soil egested on or under the soil surface). Earthworm gut microbiota acts as a selective filter for soil microorganisms, shapes microbial communities of soil and either up- or down-regulates microbial populations (Byzov et al., 2007; Egert et al., 2004; Gómez-Brandón et al., 2011). It has been shown that earthworms may have microbial beneficial activities especially in the transport of bacterial inocula through soil (Thorpe et al., 1996), but earthworms may also act as pests by promoting the dissemination of plant pathogens such as *Phytophthora cactorum* and *Fusarium reticulatum*

(Montecchio et al., 2015). More interestingly, a few studies have described that human and animal pathogenic bacteria, viruses and parasites, especially *Escherichia coli* O157:H7, foot-and-mouth disease virus and *Cestoda* tapeworms, may be carried and spread by earthworms (Edwards and Bohlen, 1996; Prysor Williams et al., 2006).

Although animal dung is a very attractive food for earthworms (Lowe and Butt, 2005), few studies have evaluated the role of earthworms in the survival and the dissemination of potential pathogenic mycobacteria from animal dung or manure to surrounding soil (Fischer et al., 2003). In addition, since earthworms represent an important part of the diet of various animal species, including badgers and wild boar (Granval and Muys, 1995; Lee, 1985), the consumption of contaminated earthworms (gut carriage) might be a source of contamination for wild fauna.

With the aim to investigate the above hypothesis, this current study was first devoted to assess the impact of earthworm activity on *M. bovis* transfer from animal dung to their released castings and the surrounding soil. Then the *M. bovis* gut carriage and the casting contamination following ingestion of infected feces were investigated.

MATERIAL AND METHODS

***Mycobacterium bovis* strain preparation**

Mycobacterium bovis BCG strain Pasteur 1173P2 was grown aerobically at 37°C in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10 % Middlebrook ADC Growth Supplement (Sigma-Aldrich, France). The *M. bovis* inoculum was prepared as following: a 10 mL stationary phase culture was pelleted and once the supernatant removed the cell aggregates were disrupted by vortexing with glass beads for 15 seconds. The pellet was suspended in 1 mL of sterile water and serial 10-fold dilutions of the suspension were spiked on modified Middlebrook 7H11 plates (Middlebrook 7H11 supplemented with 10 % heat inactivated bovine serum (Dominique Dutscher, France) and 10 % Middlebrook OADC Growth Supplement (Sigma-Aldrich, France) for enumeration. The plates were always incubated at 37°C for 2 months. A 10-fold dilution of the prepared *M. bovis* suspension was also directly quantified with the RD4 qPCR assay described in the section "*Mycobacterium bovis* quantitative PCR (qPCR)".

Soil, cattle feces and earthworms characteristics

A bTB-free pasture (that has never been grazed by bTB infected cattle) located in Burgundy (Middle East of France) was selected to sample the soil used in this study. This latter is a clayey loamy soil with a pH of 7.75. Organic carbon and nitrogen contents were 3.61 and 3.8 g.kg⁻¹, respectively. The soil was sieved to 4 mm and stored at 4°C until its use.

Fresh cattle feces were collected from a bTB-free Charolais cattle in a bTB-free area of Burgundy and

immediately used.

The adult anecic earthworms (*Lumbricus terrestris*) were provided by Lombri'Carraz (France) and kept at 4°C in large buckets containing soil and organic matter until starting the study. Soil, earthworms and cattle feces used in this work were previously proved to be negative for the presence of *M. bovis* using the qPCR-based assay.

DNA extraction and purification

DNAs from all the samples collected were extracted as described previously (Dequiedt et al. 2011). Briefly, 8 mL of lysis buffer (100 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl and 2% (w/v) SDS), 4 g of silica beads (100 µm diameter), 5 g of ceramic beads (1.4 mm diameter) and 8 glass beads (4 mm diameter) were added to 2 g of sample in a 15 ml sterile vial - whereas, 1 mL of lysis buffer, 0.5 g of silica beads, 0.625 g of ceramic beads, 1 glass beads were added to 250 mg-samples. Samples were disrupted for 3 × 30 s at 4 m/s in a FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France), incubated for 30 min at 70 °C and centrifuged for 5 min at 7000 ×g at room temperature. Supernatants were incubated on ice for 10 min with 1/10 volume of 3 M potassium acetate pH 5.5 and then centrifuged for 5 min at 14,000 × g. One volume of ice-cold isopropanol was added to the supernatant for DNA precipitation overnight at – 20 °C. DNA was collected by centrifugation (30 min at 14,000 × g), and DNA pellets were washed with ice-cold ethanol (70%) and dissolved in 100 µl of water. Crude DNA extracts (100 µl) were loaded on Microbiospin™ columns (Biorad, Marnes-La-Coquette, France) filled with 100 mg of polyvinyl polypyrrolidone (PVPP, Sigma Chemical Co, France). After centrifugation (4 min, 1,000 × g, 4 °C), eluted DNA was further purified using the GeneClean Turbo Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Purified DNA concentrations were estimated by spectrophotometry (λ = 260 nm) using a NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Illkirch, France).

***Mycobacterium bovis* quantitative PCR (qPCR)**

Mycobacterium bovis-specific qPCR was set up targeting the RD4 flanking region using previously described forward RD4 flanking primer (5'-TGTGAATTCATACAAGCCGTAGTCG-3') and probe (5'-6-FAM-AGCGCAACACTCTTGGAGTGGCCTAC-3' TAMRA) (Sweeney et al., 2007). In order to improve qPCR efficiency, the reverse RD4 flanking primer based assay was modified (5'-ATCTTAGCTGGTCAATAGCCATTTTT-3') to reduce the size of the qPCR product to 116 bp.

qPCR reactions were carried out in triplicate with a 25 µL reaction mix containing 12.5 µL of Absolute™ QPCR ROX Mix (Thermo Scientific, France), 1 µL (final concentration 25 ng.µL⁻¹) of T4 bacteriophage gene 32 product (MP Biomedicals Europe, France), 1 µL of each primer (final concentration 400 nmol.L⁻¹), 0.5 µL of each probe (final concentration 200 nmol. L⁻¹), 4 µL of ultrapure

water and 5 μL of pure or diluted (10- or 20-fold) DNA. Absolute quantification was achieved using standard DNA dilutions. A recombinant plasmid containing one copy of the RD4 fragment of *M. bovis* BCG strain Pasteur 1173P2 cloned in the pCR[®]II-TOPO[®] vector (Invitrogen, France) was used as a standard. A calibration curve was obtained by amplification of serial dilutions of the plasmid ranging from 1 to 10^6 copies per PCR reaction. All DNA samples extracted from the soil, castings and feces samples were screened with the RD4-based qPCR assay and results were expressed as the number of *M. bovis* gene copies per g of soil, castings or feces. We previously assessed that when Cycle threshold (Ct) was above 39, detection was possible but unreliable (unpublished results). The word “traces” was then chosen in all further experiments in order to indicate that *M. bovis* targets are present in very low quantities (below 250 CFU.g⁻¹ of soil). The qPCR assay was performed in a VIIA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, France). Initial denaturation was done at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles with denaturation at 95°C for 15 s, annealing and elongation at 60°C for 1 min.

Mesocosms preparation

Plastic jars (1.5 L) were filled with 1 kg of the clay-loamy soil. Sterile water was added to each soil sample to reach final soil moisture of 80 % of the water-holding capacity (WHC). Once the soil was packed down to obtain a 1 g.cm⁻³ soil density, 6 earthworms *Lumbricus terrestris* were placed into each jar. A 4-days delay was necessary to acclimatize the earthworms. Nine control mesocosms where no earthworms were added were processed and analysed.

Evaluation of earthworm dissemination of *M. bovis* to soil mesocosms

Aliquots of 50 g of cattle feces previously spiked with 1 mL of *M. bovis* BCG suspension were layered on the soil surface of each mesocosm. Jars were covered with pierced fitted lids and kept in a dark room at 20°C in a L2 confinement facility (day 0).

In order to sample fresh earthworm castings, all the castings were removed 48 h before each sampling date. A sampling schedule *i.e.* 2, 4, 7, 10, 14, 21, 30, 45 and 60 days was followed. For each sampling date, 2 mesocosms with earthworms and one control mesocosm were analysed as following. First, earthworm castings were collected at the surface of each mesocosm containing earthworms, pooled, homogenized and then aliquoted in triplicate in 2 g-samples. Secondly, the cattle feces and earthworms were removed out of the mesocosms and the remaining soil was mixed and aliquoted in triplicate in 2 g-samples. Finally, the six earthworms contained in each mesocosm were rinsed twice with sterile water, dried with a paper towel and individually transferred into a 60 mL empty vessel. After a 48h incubation at 20°C in a dark room to release the gut content, one 250 mg-aliquot of fecal samples was sampled for each earthworm. In the control mesocosm, the cattle feces were removed from the top of mesocosm, the soil was then mixed, sampled and analysed as described above. All

samples were frozen at -20°C until their DNA extraction and RD4 qPCR analysis. Gene copy numbers found in each sample were box-cox transformed before analysis to normalize the data. Generalized Linear Models (GLMs) were used to analyze the effects of sampling date (number of days after the *M. bovis* spiked cattle feces was layered onto the soil) and treatment (feces, castings and soil) on the number of CFU. Tests were performed using JMP 7.0 Software (SAS Institute Inc.). Results were considered to be significantly different for P values < 0.05 .

Gut carriage and excretion of *M. bovis* by earthworms.

Five mesocosms each containing 6 earthworms were prepared as described in the section “mesocosm preparation” and were then covered with 50 g of cattle feces spiked with 1 mL of *M. bovis* BCG suspension. After 7 days of incubation, each earthworm was rinsed twice with sterile water, dried with a paper towel. To estimate *M. bovis* carriage on earthworm tegument, 6 earthworms out of the 30 were deposited in an individual Petri plate containing modified Middlebrook 7H11 media supplemented with antibiotics and antifungal ($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ticarcillin, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Trimethoprim, $200\ 000\text{ UI}\cdot\text{L}^{-1}$ Polymyxin B and $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cycloheximid, Sigma-Aldrich, France). After gently moving it on the plate surface for few minutes, the earthworms were individually transferred in a 200 mL vessel containing 100 g of *M. bovis*-free fresh soil, as well as the 24 earthworms. This step corresponded to the starting point of the experiment (day 0).

At each sampling date *i.e.* day 1, 2, 3, 4 and 5, the castings from series of 6 randomly selected remaining vessels were collected, pooled, homogenized and one aliquot of 2 g was sampled. Then the earthworms from 1 series of 6 vessels were removed, rinsed twice with sterile water, dried with a paper towel and individually transferred in a 60 mL empty vessel. After 48h at 20°C in a dark room, the animals have released their gut contents and a 250 mg-aliquot of fecal sample was recovered from each vessel containing earthworms. All of the samples were stored at -20°C until further analysis.

RESULTS

Earthworm dissemination of *M. bovis* from cattle feces spiked with the mycobacteria to soil mesocosms

For this purpose, the protocol sketched in Figure 1 was carried out over a 60 days-period and the results are summarized in Figure 2. Both the culture-based method and the RD4 qPCR assay were used to estimate the concentration of the *Mycobacterium bovis* BCG suspension used to spike the cattle feces. Different values of 1.25×10^7 CFU per mL and of $(6.5 \pm 0.5) \times 10^8$ gene copies per mL were determined with the culture and the molecular methods, respectively. However, given that only the RD4 qPCR assay was carried out to quantify *M. bovis* throughout this experiment, the *M. bovis* genome

equivalent number contained in the 50 g of cattle feces was estimated to $(6.5 \pm 0.5) \times 10^8$ at the beginning of the experiment (day 0; dashed line in Figure 2).

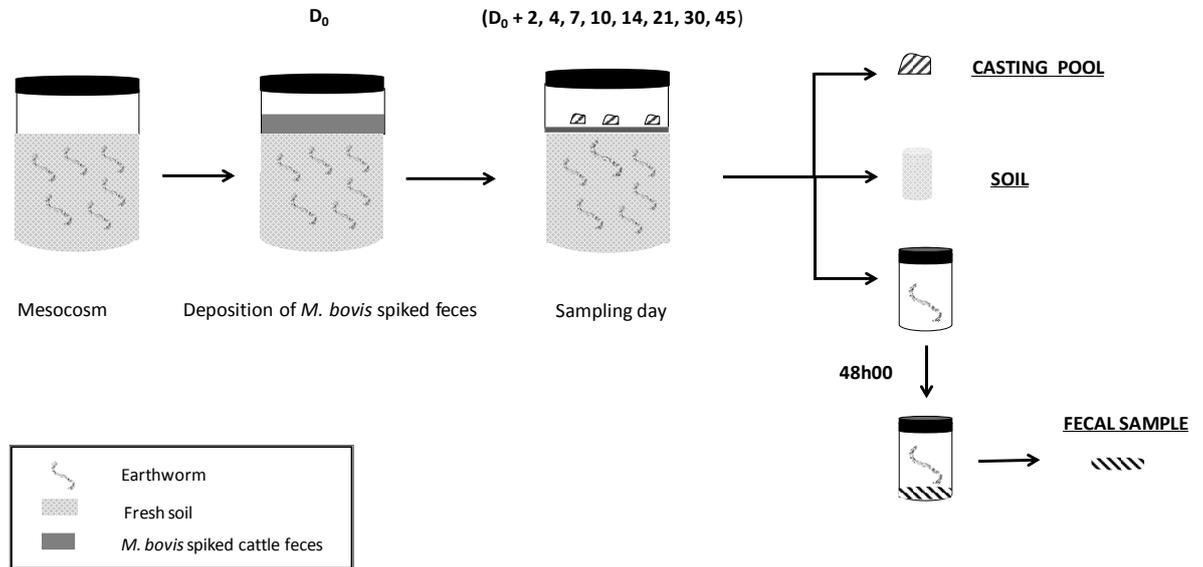


Figure 1. Schematic representation of the procedure followed for the evaluation of *M. bovis* dissemination in soil by earthworms

Overall *M. bovis* was repeatedly detected in all of the analysed samples *ie.* earthworm castings, fecal samples and soils from 2 days after depositing the cattle feces spiked with *M. bovis* on the surface of the mesocosms. Gene copy number was significantly influenced by the sampling date (df= 8, $\chi^2 = 145.08$, $P < 0.0001$), treatment (df= 2, $\chi^2 = 224.30$, $P < 0.0001$) and interaction between sampling date and treatment (df= 16, $\chi^2 = 144.64$, $P < 0.0001$). However, at the end of the experiment (day 60), *M. bovis* gene copy numbers were not statistically different (Average and P value) whatever the kind of samples. More precisely, the earthworm fecal samples (open circle, Figure 2) showed the highest contamination (up to $(5.7 \pm 0.3) \times 10^6$ *M. bovis* gene copies per g) at day 2 while the *M. bovis* gene copy numbers in the fecal samples decreased (20-fold factor) after day 4 to reach a final value of $(2.5 \pm 2.2) \times 10^5$ gene copy number per g. On the other hand, the *M. bovis* gene copy numbers per g of earthworm castings were up to around 10-fold lower than those per g of earthworm fecal samples until day 45 after which similar *M. bovis* gene concentrations were measured (full circle, Figure 2). Although soil samples from mesocosms also led to a *M. bovis* positive signal from day 2 (4.4 ± 4.2) $\times 10^4$ gene copy number per g), it is worth noting that only 4 out of the 6 analyzed samples were positive at day 2 (full square, Figure 2). Afterwards (*i.e.*, from day 4), all of the soil samples gave a positive signal for *M. bovis* with a strong increase (10-fold) of the *M. bovis* gene copy number per g of soil between day 2 and day

7 followed by minor fluctuations until day 60. For the control mesocosms (*i.e.*, without any earthworms), no *M. bovis* signal were measured in the soil samples throughout the experiment until day 60 where a positive signal value of $(3.5 \pm 1.9) \times 10^4$ *M. bovis* per g of soil was obtained (cross symbol on Figure 2) thus indicating a very slow spread of *M. bovis* in the bulk soil in the absence of earthworms. Finally, it should be noticed that the cattle feces remained undisturbed in the control mesocosms over the course of the experiment whereas the earthworms totally ingested the spiked cattle feces in all of the mesocosms containing these animals during the first week of the experiment.

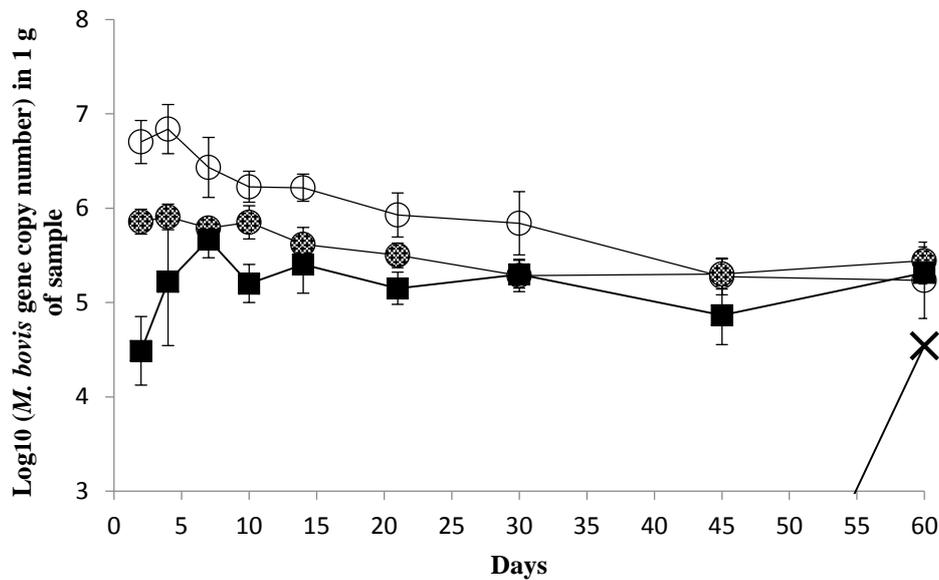


Figure 2. Concentration of *M. bovis* DNA determined by RD4 qPCR in ■ soil, ● earthworm castings and ○ fecal samples recovered at each sampling date. Concentrations of *M. bovis* DNA in control mesocosms are represented with crosses (x). The dashed line corresponds to the concentration of *M. bovis* spiked in 50 g of cattle feces. Error bars represent the standard deviation values of 3 replicates.

Table 1: RD4-based qPCR detection of *M. bovis* gene copy number contained in the earthworm castings recovered according to the protocol of Figure 2

Sampling day	Number of analysed casting pools ^a	Number of positive casting pools ^b	<i>M. bovis</i> gene copy number per g ^c
1	5	5	$(1.96 \pm 1.36) \times 10^5$
2	4	4	$(1.04 \pm 0.60) \times 10^5$
3	3	2	Traces ^d
4	2	1	Traces
5	1	0	Negative

^a. From 6 vessels

^b. Threshold cycle (Ct) between 20 and 39

^c. Mean value calculated with the signal obtained for the positive earthworm casting pools

^d. Detected but not quantifiable (below 250 CFU.g⁻¹ of soil)

Evaluation of the carriage and the excretion of *M. bovis* by earthworms

In order to check whether earthworms carry *M. bovis* in their gut and are able to excrete the bacteria, the following experiment was realized (see detailed protocol in Figure 3). Earthworms were artificially contaminated by feeding for 7 days from cattle feces spiked with *M. bovis* then their castings and their fecal samples were analysed for a 5-days period. First, no growth of *M. bovis* was observed from earthworm tegument surfaces, suggesting the absence or the low carriage of *M. bovis* by earthworm teguments. The results shown in Table 1 indicated that all of the earthworms produced castings highly contaminated with *M. bovis* 1 and 2 days after their introduction in the fresh *M. bovis* free soil (up to around 10^5 *M. bovis* gene copy number per g). Then the percentage of positive *M. bovis* casting pools gradually decreased (66 and 50 % for sampling day 3 and 4, respectively) until the sampling at day 5 for which no *M. bovis* molecular signal was detected. Although positive signals were obtained for the sampling days 3 and 4, only traces of *M. bovis* were detected (Ct above 39). With values ranging from 1 to 5×10^5 *M. bovis* gene copy number per g of fecal sample (Table 2), the RD4 qPCR assay yielded *M. bovis* positive signals for the sampling days 1 to 4. Nevertheless, for each of these sampling days some earthworms (17-50 %) led to negative *M. bovis* qPCR signal thus indicating the absence or a very low amount of *M. bovis* in the earthworm feces (below the detection limit of the qPCR). Finally, all of the six earthworm fecal samples analysed at day 5 were *M. bovis* free.

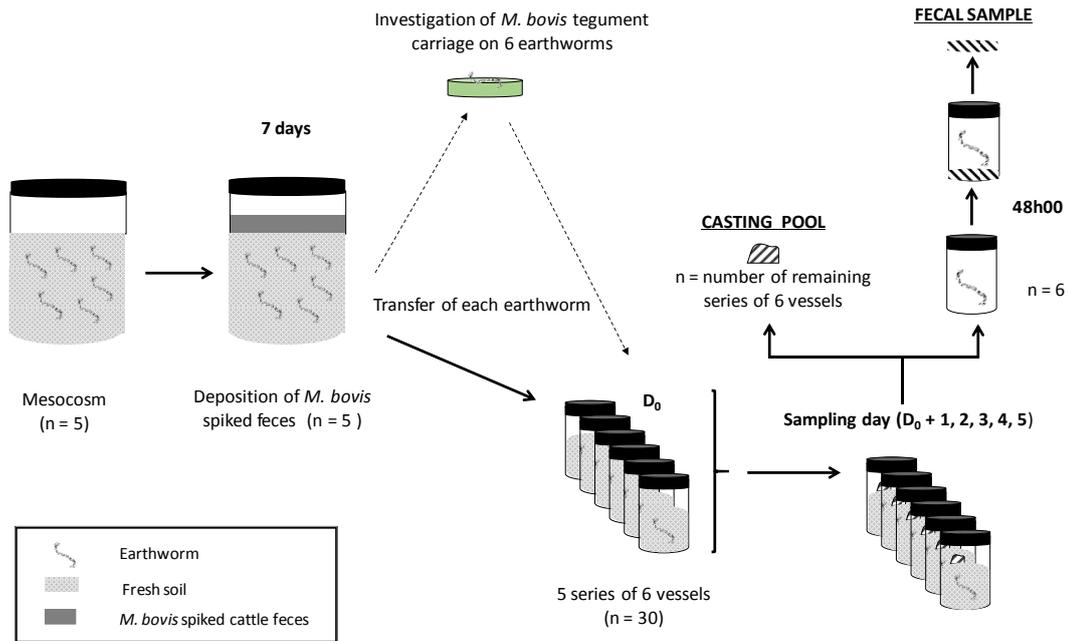


Figure 3: Schematic representation of the procedure followed for the estimation of *M. bovis* gut carriage and excretion by earthworms.

Table 2: RD4-based qPCR detection of *M. bovis* gene copy number contained in the earthworm fecal samples recovered according to the protocol of Figure 3.

Sampling day	Number of positive fecal samples ^a (n = 6)	<i>M. bovis</i> gene copy number per g ^b
1	5	$(1.23 \pm 0.82) \times 10^5$
2	4	$(2.28 \pm 2.14) \times 10^5$
3	3	$(5.42 \pm 0.49) \times 10^5$
4	4	$(2.13 \pm 1.64) \times 10^5$
5	0	Negative

^a. Threshold cycle (Ct) between 20 and 39

^b. Mean value calculated with the signal obtained for the positive earthworm fecal samples

DISCUSSION

The results shown in Figure 1 evidenced for the first time that earthworms were able to widely transfer *M. bovis* from cattle feces to their castings after ingestion of cattle feces spiked with the bacteria. Owing to the concomitant ingestion of *M. bovis*-free soil and dung remains and thus the dilution of *M. bovis* cells in the gut content, the number of *M. bovis* cells in castings gradually decreased from day 4 until the end of the experiment. These results were in good agreement with earlier reported laboratory trials with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* that is responsible for the Johne's disease in cattle and goat (Fischer et al., 2003). Prysor Williams *et al.* (Prysor Williams et al., 2006) have also reported the excretion of the human food-borne pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in castings after ingestion of spiked manure by earthworms.

On the other hand, this study demonstrated that when earthworms were maintained in the *M. bovis* infected environment, they were able to shed *M. bovis* in their castings for at least 60 days (Tableau 1). However, when transferred in a *M. bovis*-free soil, earthworms only shed the bacteria up to 4 days. This data suggests that *M. bovis* is unable to colonize the gut of the earthworm *L. terrestris* over extended periods. Moreover, *L. terrestris* may ingest 490 to 3500 mg dry mass g⁻¹ fresh mass of arable soil per day (Curry and Schmidt, 2007) and has a mean gut transit time of about 12 hours (Taylor and Taylor, 2014), leading to the rapid egestion of the bacteria from earthworm guts through castings.

Furthermore, earthworms were able to transfer *M. bovis* from cattle feces to the bulk soil by releasing castings in the tunnels they burrow. Our results showed that *M. bovis* was still detected in mixed soil over the course of the experiment (60 days), highlighting a long persistence of *M. bovis* in soil. Rapid dispersal of the bacteria in soil can be fully imputed to earthworm activity since soil from control mesocosms without earthworms remained free from *M. bovis*-except at day 60. Moreover, bacteria movement was mainly due to *M. bovis* earthworm excretion since no *M. bovis* tegument carriage was observed. The *M. bovis* signal observed in control mesocosms at day 60 is probably due to the moving of *M. bovis* cells during moisture transfer from dung to soil surface and to the presence of remaining dung particles in soil (incomplete removal of contaminated dung before soil mixing). As *M. bovis* is sensitive to solar radiation (UV) and soil dryness, the burying of *M. bovis* in deep soil by earthworms may contribute to enhance its survival in soil environment. Indeed, survival of *M. bovis* in soil may be enhanced up to 2 years when the bacteria is buried to a depth of 5 cm (Genov, 1965). Our experimental design based on 1 kg-soil mesocosms did not allow estimating the real spatial distribution of the bacilli in soil by earthworms. It has been shown that earthworms are potentially able to move several meters apart from the area where they graze organic matter (Mather and Christensen, 1988) thus disseminating soil-borne plant pathogen through large surfaces of soil (Thorpe et al., 1996). Concerning potential spread of animal or human pathogens, earthworms were demonstrated in

experimental boxes to significantly aid vertical and lateral movement of ingested bacteria, both up to 40 cm from the inoculation point (Pryor Williams et al., 2006).

Finally, we showed that earthworms may carry *M. bovis* for many days in their guts even when transferred in a *M. bovis*-free environment. Earthworms are known to host animal parasites and pathogen such as protozoan, tapeworms (*Cestoda*) and nematodes they can transmit to birds and mammals when earthworms are ingested (Edwards and Bohlen, 1996). However, to our knowledge, the fact that earthworms may act as a source of contamination for animals feeding from earthworms has never been studied. Earthworms that constitute a nutritious food resource are an important part of the diet of badgers and wild boar (Baubet et al., 2003; Cleary et al., 2011) that often forage in cattle pastures hosting high earthworm populations (Muldowney et al., 2003). Badgers and wild boar are able to eat up to 200 and 120 earthworms respectively in a night, especially during worm nights when humid and mild weather conditions are optimal for earthworms to ascend to the surface (Baubet et al., 2003; Kruuk and Parish, 1981). In endemic area of bTB where fecal *M. bovis* shedding may occur in infected animals, it would be interesting to evaluate *M. bovis* carriage in earthworm gut in the vicinity of infected animal dung. Further studies are needed to assess the role of earthworms harbouring *M. bovis* gut carriage in the contamination of bTB sensible earthworm feeders.

One field study reports the isolation of non-tuberculous mycobacteria, such as *Mycobacterium avium* complex members (*M. avium* ssp. *paratuberculosis* and *M. avium* ssp. *hominisuis*), as well as *M. abscessus*, *M. scrofulaceum* and *M. gastri*) from 9 out of 109 earthworm feces in sites where cattle, goats, and swine were severely infected with the Johne's disease or mycobacteriosis (Fischer et al., 2003). However, this study failed to isolate *M. avium* ssp. *avium* from earthworms feces in aviaries infected with avian tuberculosis.

Cattle feces were spiked with *M. bovis* at a final concentration of 1.25×10^7 CFU per 50 g of feces *ie.* 2.5×10^5 CFU per g (estimated by culture-based enumeration of the inoculum). *M. bovis* concentration in spiked cattle feces was also measured by the qPCR-based method. We observed numbers of *M. bovis* 52-fold higher when using the molecular detection method than with the culture-based method. This discrepancy is probably due first to the strong aggregation of mycobacteria cells in the inoculum despite physical disruption of cell aggregates and second to the presence of dead or viable but non-cultivable cells of *M. bovis* non detected by culture-based method. The amount of *M. bovis* spiked in cattle feces is equivalent or lower than the number of *M. bovis* cells recorded per g of urine or feces shed by infected badgers (Gallagher and Clifton-Hadley, 2000; Sweeney et al., 2007) leading to the presence of millions of bacteria in a latrine (burrowed hole in the soil where badgers defecate and urinate). But it is probably larger than *M. bovis* cells deposited in infected cattle feces (Neill et al., 1988). For practical reasons, we used cattle feces in our study but it could be interesting to compare if dung from other animals than cattle would be as attractive for earthworms.

Our study was based on a qPCR assay method detecting *M. bovis* DNA in soil, castings and feces samples. This molecular tool does not give any information on the viability of the *M. bovis* cells egested by the earthworms. However, as mycobacteria harbour a resistant waxy cell envelope (Brennan and Nikaido, 1995) and as *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and other environmental mycobacteria have been showed to largely survive through the gut passage (Fischer et al., 2003), these data strongly suggest that *M. bovis* could resist through the passage of earthworm guts and remain alive in castings. Further research is needed to clarify if tuberculous mycobacteria such as *M. bovis* are digested or survive during transit through the earthworm gut and if their virulence is conserved. Evidencing *M. bovis* presence with culture-based method in environmental matrices such as soil, castings or animal feces is still a challenge. As *M. bovis* is a slow growing mycobacteria, environmental samples have to be strongly decontaminated prior to culturing to overcome contamination with fast growing microorganisms, leading to a decrease in the sensitivity of the method.

Surface and subsurface casting shedding of *M. bovis* is all the more relevant because this pathogen bacteria may survive in soil and feces for long periods (Young et al., 2005). Castings are then within the reach of animals, especially cattle that may be infected by inhaling soil aerosols or by ingesting contaminated casting soil during their exploratory, foraging or feeding activities. While *Mycobacterium bovis* infective dose by the respiratory route is very low since only ten viable bacilli are able to cause respiratory bovine tuberculosis (Dean et al., 2005), 5000 bacilli would be required to initiate infection through the oral route in cattle (Palmer et al., 2004). As cattle usually avoid grazing close to the feces of other cattle or wild animals (Hutchings and Harris, 1997), further dissemination of *M. bovis* by earthworms away from infected feces might induce contamination risk for cattle grazing in this area.

Further work is still needed to study the occurrence of *M. bovis* in earthworms under natural field conditions in bTB-contaminated area. Cultivation of environmental *M. bovis* is also required to characterize properly these environmental strains. Finally, virulence of *M. bovis* contained in earthworm castings remains to be deciphered.

Funding information

The work was supported by the Regional Council of Burgundy (Elodie Barbier PhD fellowship), the Côte d'Or General Council, Interbev and the Côte d'Or GDS (Groupement de Défense Sanitaire: Livestock health protection group). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare

Acknowledgements

The authors would like to thank A.E. Taconet, F. Barthélémy and T. Grosjean from the Côte d'Or Regional Veterinary Service (DDPP21), F. Chevalier and M. Béral from the CIREV (Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie Vétérinaire).

References

- Baubet, E., Ropert-Coudert, Y., Brandt, S., 2003. Seasonal and annual variations in earthworm consumption by wild boar (*Sus scrofa scrofa* L.). *Wildl. Res.* 30, 179. doi:10.1071/WR00113
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A., 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* doi:10.1051/vetres
- Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E. a., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J.E., Cluzeau, D., Brun, J.J., 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 161–182. doi:10.1111/ejss.12025
- Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29–63. doi:10.1146/annurev.biochem.64.1.29
- Byzov, B.A., Khomyakov, N. V., Kharin, S.A., Kurakov, A. V., 2007. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 149–156. doi:10.1016/j.ejsobi.2007.08.012
- Cleary, G.P., Corner, L.A.L., O'Keeffe, J., Marples, N.M., 2011. Diet of the European badger (*Meles meles*) in the Republic of Ireland: A comparison of results from an analysis of stomach contents and rectal faeces. *Mamm. Biol.* 76, 470–475. doi:10.1016/j.mambio.2010.10.012
- Corner, L.A.L., O'Meara, D., Costello, E., Lesellier, S., Gormley, E., 2012. The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *Vet. J.* 194, 166–72. doi:10.1016/j.tvjl.2012.03.013
- Curry, J.P., Schmidt, O., 2007. The feeding ecology of earthworms - A review. *Pedobiologia (Jena)*. 50, 463–477. doi:10.1016/j.pedobi.2006.09.001
- Dean, G.S., Rhodes, S.G., Coad, M., Adam, O., Cockle, P.J., Clifford, D.J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 73, 6467–6471. doi:10.1128/IAI.73.10.6467
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and ecology of earthworms*. Chapman and Hall, London.
- Egert, M., Marhan, S., Wagner, B., Scheu, S., Friedrich, M.W., 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (*Oligochaeta: Lumbricidae*). *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 187–197. doi:10.1016/j.femsec.2004.01.007
- Fischer, O.A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., Du Maine, R., Melicharek, I., Bartos, M., Pavlik, I., 2003. Earthworms (*Oligochaeta, Lumbricidae*) and mycobacteria. *Vet. Microbiol.* 91, 325–338. doi:10.1016/S0378-1135(02)00302-4

- Gallagher, J., Clifton-Hadley, R.S., 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Res. Vet. Sci.* 69, 203–17. doi:10.1053/rvsc.2000.0422
- Genov, I., 1965. The effects of certain physical and chemical agents on *Mycobacterium tuberculosis*. *Veteriárni Med. Nauk. Sofia* 2, 97–107.
- Gómez-Brandón, M., Aira, M., Lores, M., Domínguez, J., 2011. Epigeic Earthworms exert a bottleneck effect on microbial communities through gut associated processes. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0024786
- Granval, P., Muys, B., 1995. Predation on earthworms by terrestrial vertebrates, in: XII Congress “The Game and the Man.” Sofia, Bulgaria, p. 480.
- Hutchings, M.R., Harris, S., 1997. Effects of farm management practices on cattle grazing behaviour and the potential for transmission of bovine tuberculosis from badgers to cattle. *Vet. J.* 153, 149–62.
- Kruuk, H., Parish, T., 1981. Feeding specialization of the European badger *Meles meles* in Scotland UK. *J. Anim. Ecol.* 50, 773–788. doi:10.2307/4136
- Lavelle, P., Spain, A., 2001. *Soil ecology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lee, K.E., 1985. *Earthworms: their ecology and relationship with soils and land use*, Academic P. ed.
- Lowe, C.N., Butt, K.R., 2005. Culture techniques for soil dwelling earthworms: A review. *Pedobiologia (Jena)*. 49, 401–413. doi:10.1016/j.pedobi.2005.04.005
- Mather, J.G., Christensen, O., 1988. Surface movements of earthworms in agricultural land. *Pedobiologia (Jena)*. 32, 399–405.
- Montecchio, L., Scattolin, L., Squartini, A., Butt, K., 2015. Potential spread of forest soil-borne fungi through earthworm consumption and casting. *iForest* 8, 295–301. doi:10.3832/ifor1217-008
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R., 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 40, 153–77.
- Muldowney, J., Curry, J., Okeeffe, J., Schmidt, O., 2003. Relationships between earthworm populations, grassland management and badger densities in County Kilkenny, Ireland. *Pedobiologia (Jena)*. 47, 913–919. doi:10.1016/S0031-4056(04)70289-9
- Neill, S.D., Hanna, J., O’Brien, J., McCracken, R., 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340–343. doi:10.1136/vr.123.13.340
- Palmer, M. V., 2013. *Mycobacterium bovis*: Characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 1–13. doi:10.1111/tbed.12115
- Palmer, M. V., Waters, W.R., Whipple, D.L., 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1483–1489. doi:10.2460/ajvr.2004.65.1483
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 74, 1–15.

- Pryor Williams, A., Roberts, P., Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L., 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 54–64. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00142.x
- Sweeney, F.P., Courtenay, O., Hibberd, V., Hewinson, R.G., Reilly, L. a, Gaze, W.H., Wellington, E.M.H., 2007. Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by real-time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7471–3. doi:10.1128/AEM.00978-07
- Taylor, A.R., Taylor, A.F.S., 2014. Assessing daily egestion rates in earthworms: using fungal spores as a natural soil marker to estimate gut transit time. *Biol. Fertil. Soils* 50, 179–183. doi:10.1007/s00374-013-0823-5
- Thorpe, I.S., Prosser, J.I., Glover, L. a, Killham, K., 1996. The role of the earthworm *Lumbricus terrestris* in the transport of bacterial inocula through soil. *Biol. Fertil. Soils* 23, 132–139.
- Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J.M., Fernández-De-Mera, I.G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C., 2007. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet. Res.* 38, 451–464. doi:10.1051/vetres:2007002
- Young, J.S., Gormley, E., Wellington, E.M.H., 2005. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1946–1952. doi:10.1128/AEM.71.4.1946

C. COMPLEMENT : PRELEVEMENT ET ANALYSE DE LOMBRICS DANS UNE PATURE SUSPECTE

Afin d'évaluer la contamination naturelle éventuelle des lombrics par *M. bovis*, nous avons analysé 90 lombrics prélevés en février 2014 à proximité d'une source permanente d'une des pâtures suspectes de l'Auxois, où des bovins infectés ont pâturé l'été précédent (Site C de l'étude environnementale Chapitre 2) Les lombrics ont été prélevés le même jour que les trois échantillons positifs de ce site (eau, sédiments, nématodes). Sur sept points de la pâture choisis au hasard, une pelletée d'environ 20 kg de sol a été retournée. Les vers ont été séparés du sol, rincés avec de l'eau et transférés individuellement dans des pots en plastique de 60 mL. Les pots ont été stockés 48 h à 20°C dans l'obscurité afin de laisser les vers se vider. Pour chaque point de la pâture prélevé, les fèces des vers ont été poolées et homogénéisées, puis 2 g ont été prélevés et congelés jusqu'à la réalisation de l'analyse. Après extraction de l'ADN, chaque échantillon a été analysé en qPCR avec le système de détection RD4. Les protocoles utilisés sont décrits dans le Matériel et Méthodes de l'article précédent.

L'identification phénotypique des 90 vers collectés dans la pâture a permis de mettre en évidence cinq genres de lombric différents : *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus castaneus*, *Nicodrilus* sp., *Octololium cyaneum*, *Allolobophora* sp., *Aporrectodea caliginosa*.

Aucun des sept pools de fèces analysés n'a donné de signal positif en qPCR avec le système RD4.

D. BILAN

Les lombrics sont de gros consommateurs de matière organique, naturellement chargée d'une flore abondante et variée, et potentiellement d'une flore bactérienne pathogène. Toutefois, il existe très peu de données sur la dissémination des bactéries pathogènes pour l'homme et les animaux par les lombrics dans le sol, ainsi que sur les risques liés au portage intestinal de bactéries pathogènes par les lombrics pour les animaux qui les consomment.

L'étude décrite dans l'article précédent montre qu'après avoir ingéré des matières fécales fraîches inoculées, les lombrics ont la capacité de disséminer rapidement *M. bovis* dans le sol environnant par le biais des turricules qu'ils émettent à la surface du sol et en profondeur dans les tunnels qu'ils creusent. L'enfouissement de la bactérie dans le sol permet probablement d'améliorer la persistance de la bactérie, en la protégeant des UV et de la déshydratation. D'autre part, le transfert de la bactérie à quelques cm des déjections animales contaminées par le biais des turricules de surface, la rend plus accessible aux animaux (qui en général évitent les fèces des autres animaux). Ainsi, en fonction des comportements exploratoires ou alimentaires des différentes espèces fréquentant les pâtures, il existe un risque potentiel de contamination par du sol ou des turricules contaminés (inhalation de bioaérosols ou ingestion).

Nous avons également montré que le tube digestif des lombrics ne constituait pas un réservoir pérenne de *M. bovis*, la bactérie n'était détectée que transitoirement (4 jours) après avoir remis les lombrics dans un sol sain. Le portage digestif pendant les 4 premiers jours constitue toutefois un risque pour les animaux qui consomment les lombrics en grande quantité, notamment les blaireaux et les sangliers.

Cette étude soulève les mêmes inconnues que les études précédentes, principalement sur la viabilité, l'état physiologique et la conservation de la virulence de *M. bovis* après un transfert dans le sol ou suite au passage de la bactérie dans le tube digestif des lombrics. Ces facteurs sont indispensables pour permettre l'infection d'animaux *via* des matrices environnementales contaminées. Les moyens d'évaluation de ces différents facteurs seront discutés dans la partie Perspectives du manuscrit.

Discussion générale

Depuis 2004, face à la recrudescence de la tuberculose bovine en Côte d'Or, la mise en place d'un programme de lutte sanitaire régulièrement amélioré contre la maladie a permis de contrôler et d'améliorer la situation dans l'élevage bovin depuis 2010. Dans la zone endémique du département, la circulation de *Mycobacterium bovis* dans un système multi-hôte spécifiques, impliquant les bovins et des espèces sauvages, complique fortement la lutte contre la maladie, notamment par la difficulté à gérer l'infection dans la faune sauvage malgré les mesures de contrôle entreprises jusqu'à maintenant. La transmission indirecte de la maladie entre animaux sauvages et bovins par le biais de substrats environnementaux contaminés est fortement suspectée dans les zones où bovins et faune sauvage infectés partagent les mêmes territoires et ressources. La transmission environnementale a déjà été démontrée en conditions expérimentales (Little et al. 1982; Palmer et al. 2004), mais elle est très difficile à démontrer en conditions naturelles et passe notamment par l'évaluation du niveau d'excrétion par les animaux infectés, du rôle de l'environnement comme réservoir de la bactérie, de sa survie dans un état viable et du maintien de sa virulence.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient d'une part d'évaluer la contamination environnementale en Côte d'Or sur des agroécosystèmes fréquentés par des bovins et/ou des animaux sauvages potentiellement infectés, dans le but de mettre en évidence des réservoirs environnementaux éventuels. D'autre part, nous avons cherché à préciser les facteurs impliqués dans la persistance de *M. bovis* dans le sol et sa dissémination par la micro- et mésofaune du sol.

1. Des méthodes développées (ou adaptées) puis validées dans des matrices environnementales

Notre objectif initial pour l'analyse des échantillons environnementaux était d'utiliser en parallèle la PCR quantitative après extraction/purification de l'ADN pour la détection et la quantification de *M. bovis* et une méthode basée sur la culture afin d'isoler les souches environnementales pour les caractériser. Cependant, les protocoles de prétraitement et de culture tirés de la littérature (immunocapture et protocoles de décontamination) que nous avons utilisés en première intention sur les échantillons environnementaux n'ont pas donné les résultats escomptés du fait de la croissance très lente de *M. bovis* et de la présence dans les échantillons de très nombreux microorganismes interférents à croissance rapide qui ont gêné la culture (envahissement rapide des boîtes en une semaine). La culture de *M. bovis* à partir d'échantillons environnementaux reste à l'heure actuelle un challenge (Fine, O'Brien, et al. 2011; Fine, Bolin, et al. 2011; Young et al. 2005; King et al. 2015) notamment à cause de l'absence de milieux suffisamment sélectifs et de bouillons d'enrichissement

adaptés, comme il en existe notamment pour l'isolement de bactéries pathogènes telluriques telles que *Listeria monocytogenes* ou *Pseudomonas aeruginosa*. En l'absence de méthodes disponibles, nous avons donc mis au point deux protocoles très innovants à la fin de nos travaux : un protocole d'extraction/décontamination des mycobactéries dans le sol et une méthode de détection des mycobactéries en culture liquide. Ces deux méthodes sont en cours d'évaluation par la SATT (Société d'Accélération de Transfert de Technologies) en vue d'une valorisation sous forme de savoir-faire ou de brevet. Des études complémentaires seront nécessaires pour développer ces outils innovants.

La recherche de réservoirs environnementaux potentiels de *M. bovis* en Côte d'Or a donc été basée sur l'utilisation de méthodes moléculaires adaptées aux matrices environnementales. Contrairement aux méthodes culturales, la qPCR permet une détection et une quantification rapide des ADN cibles, sans être gênée par la présence de contaminants. Face au grand nombre de mycobactéries potentiellement présentes dans les sols de Côte d'Or, dont *M. microti* (Michelet et al. 2015), nous avons choisi d'utiliser trois systèmes ciblant trois séquences différentes dans le génome des espèces du MTBC ou de *M. bovis* que nous avons développés et validés pour leur spécificité et leur sensibilité. L'utilisation conjointe de ces trois systèmes nous a permis d'augmenter la spécificité de la détection. Toutefois, le faible niveau de détection observé dans certains échantillons ne nous a pas permis de quantifier le MTBC ou *M. bovis* dans tous les échantillons.

2. Contamination environnementale : les zones humides, les eaux de ruissellement et les sols de terriers sont potentiellement à risque

Les systèmes moléculaires développés ont été utilisés pour l'analyse de plus de 400 échantillons environnementaux variés prélevés dans les agroécosystèmes de la zone endémique de Côte d'Or et de Charente. La contamination environnementale a été détectée de façon répétée dans deux types d'écosystèmes bien particuliers: les zones humides présentes sur les pâtures (sources et « mouilles »), les terriers et latrines de blaireaux.

Concernant les zones humides, nous avons mis en évidence une contamination dans l'eau circulante et les sédiments de deux sources naturelles et permanentes situées sur des pâtures utilisées par deux cheptels différents dans deux communes différentes. Cette faible contamination de l'eau et/ou des sédiments retrouvée à l'endroit de la résurgence ainsi que sur différents points en aval est une donnée nouvelle, puisqu'à ce jour *M. bovis* n'avait été isolée que dans l'eau stagnante et ses sédiments (Santos et al. 2015). Lors de nos campagnes de prélèvements, nous avons constaté que ces résurgences, parfois captées dans des abreuvoirs, étaient parfois le seul moyen d'abreuvement des bovins dans les pâtures. Ces zones humides semblent très attractives pour les bovins au vu des indices de présence constatés (matières fécales et nombreuses empreintes). La persistance de *M. bovis* étant

favorisée dans les matrices humides riches en matière organique et dans l'eau (Young et al. 2005; Fine, Bolin, et al. 2011; Duffield & Young 1985; Wint et al. 2002), ces zones constituent un milieu favorable à la survie de la bactérie. Dans notre étude, la mise en évidence de la contamination des zones humides dans des pâtures suspectes corrobore le résultat de l'étude PatRisk, dans laquelle une association significative a été établie entre la présence de mouilles et le statut « à risque d'une pâture » (Bouchez-Zacria 2015).

L'origine de la contamination de ces sources et « mouilles » est inconnue, toutefois elles sont accessibles aux bovins et animaux sauvages infectés qui peuvent potentiellement excréter la bactérie lors de l'abreuvement ou du fouissement. Vu le contexte géomorphologique, il est également envisageable que les infiltrations d'eau dans les plateaux calcaires coiffant les vallées entraînent avec elles des matrices environnementales fortement contaminées (latrines, sols) qui ressortent au niveau des pâtures, avec toutefois un effet de dilution très important.

Des mesures de biosécurité visant à limiter les risques liés aux zones humides sont déjà préconisées par la DDPP 21 et le GDS 21 à l'échelle de la pâture. L'aménagement d'abreuvoirs peu accessibles aux animaux sauvages et la condamnation par des clôtures de l'accès des bovins aux « mouilles », propices à la survie de la bactérie, sont fortement conseillés aux éleveurs des zones à risque pour limiter le risque de transmission indirecte de la maladie. Le drainage des pâtures est une solution envisagée pour assécher les zones humides et canaliser les sources dans les pâtures à risque, mais il est strictement réglementé et soumis à autorisation avec enquête publique sous le contrôle de la Police de l'eau (Direction Départementale des Territoires). La corrélation de nos résultats sur la contamination des zones humides avec le bilan des foyers bovins et des cas sauvages, ainsi que les résultats de l'étude PatRisk, ont initié une réflexion entre la DDPP21, la CIREV, le GDS et le SIRTAVA (Syndicat Intercommunal pour la Réalisation des Travaux d'Aménagement de la Vallée de l'Armançon) pour évaluer la faisabilité de travaux de drainage dans les pâtures à risque, dans le respect de la réglementation. Un problème se pose toutefois pour les pâtures présentant de très nombreuses résurgences temporaires sur lesquelles le drainage n'est pas envisageable. L'utilisation de ces pâtures pour d'autres productions animales (ovins, chevaux) ou végétales (production de foin, la mise en culture n'est pas toujours possible à cause des pentes) est une solution.

Notre étude a également mis en évidence la contamination des sols de terriers de blaireaux par *M. bovis*. Le génotype retrouvé dans les sols de terriers est identique à celui retrouvé chez les blaireaux infectés piégés à proximité, confirmant que cette espèce a la capacité de contaminer son milieu de vie (Young et al. 2005; Courtenay et al. 2006; Sweeney et al. 2006; Sweeney et al. 2007). Dans cette espèce, des animaux excréteurs et super excréteurs ont été mis en évidence en Côte d'Or (Payne 2014), expliquant les quantités importantes de bacilles retrouvées dans les sols de terrier (Young et al.

2005; Courtenay et al. 2006) et les latrines dans notre étude. La détection d'un signal moléculaire pendant 12 mois dans plusieurs entrées d'un même terrier suggère fortement que les sols de terriers peuvent constituer un réservoir environnemental pour *M. bovis*. La survie des mycobactéries est favorisée dans ces structures complexes et profondes où règne un microclimat propice (Moore & Roper 2003), tant au niveau de la stabilité de la température, de l'humidité optimale que de la protection contre les UV. Ce réservoir potentiel représente un risque pour le maintien de la maladie dans le groupe social de blaireaux qui partage le terrier, notamment pour les blairotins qui y naissent pendant l'hiver, mais aussi entre les groupes sociaux, qui peuvent régulièrement changer de terriers. Lorsqu'ils sont localisés dans les pâtures et sont accessibles aux bovins, le sol des terriers contaminés représenterait un risque potentiel pour les bovins qui les explorent, notamment un risque d'inhalation de bioaérosols contaminés générés à partir de sol. Enfin, les sols et latrines contaminés, souvent en limite des plateaux calcaires, seraient susceptibles d'être à l'origine de la contamination des pâtures par le biais des infiltrations d'eau, des phénomènes de résurgence d'eau et de ruissellement.

Les mesures de biosécurité préconisant la clôture des terriers situés dans les pâtures semblent essentielles à respecter par les éleveurs si l'on considère la longue persistance de la bactérie dans ce biotope particulier. Le repeuplement des terriers contaminés ne fait l'objet d'aucun contrôle à l'heure actuelle. Sous le contrôle du CSRPN (Conseil Scientifique Régional du Patrimoine Naturel), une étude est actuellement en cours en Côte d'Or pour l'étude de faisabilité d'un protocole de dépeuplement des terriers (piégeage de tous les individus du groupe) associé à un traitement des tunnels par des répulsifs permanents pour éviter la recolonisation immédiate.

La prévalence de *M. bovis* dans l'environnement des animaux infectés en Côte d'Or est probablement sous-estimée dans notre étude à cause de limites temporelles, spatiales et méthodologiques auxquelles nous avons fait face. En premier lieu, il existe un délai incompressible de plusieurs semaines à plusieurs mois entre les trois évènements suivants : i) la contamination environnementale par un animal excréteur (bovin ou faune sauvage), ii) le diagnostic de l'infection chez cet animal (après prophylaxie et abattage pour les bovins en hiver et piégeage pour les blaireaux au printemps et en été), et iii) le prélèvement et l'analyse d'échantillons environnementaux dans les zones de vie de ces animaux. Cette limite temporelle est également évoquée par d'autres auteurs (Fine, O'Brien, et al. 2011). Il serait idéal d'effectuer les prélèvements environnementaux dans un délai le plus court possible après l'excrétion du bacille par un animal infecté, toutefois ce délai dépend du rythme des prophylaxies et de la fréquence du piégeage des blaireaux. De plus, sur le terrain, malgré notre stratégie d'échantillonnage ciblant les zones partagées préférentiellement par la faune domestique et sauvage, les surfaces à prélever restent importantes. L'analyse de la totalité des surfaces ciblées est humainement, techniquement et économiquement irréalisable, le nombre de prélèvements a donc dû

être optimisé pour aboutir à une analyse pertinente. Les résultats obtenus ne donnent de ce fait qu'une image partielle de la contamination réelle des zones prélevées. Enfin, la charge bactérienne de certains prélèvements environnementaux n'a pu être quantifiée, signifiant que les quantités de cibles présentes étaient proches des limites de détection de nos systèmes moléculaires. Pour ces différentes raisons, nous ne pouvons donc pas exclure une contamination environnementale plus large avec des quantités très faibles de *M. bovis*.

3. Survie et circulation de *M. bovis* dans l'environnement

La survie des bactéries dans le sol dépend des facteurs biotiques et abiotiques qui caractérisent ces sols. Les différentes études sur la survie de *M. bovis* ont essentiellement considéré les facteurs abiotiques climatiques, telles que la température, l'humidité et l'exposition aux UV dans un seul type de sol (Young et al. 2005; Jackson et al. 1995; Duffield & Young 1985). Nous avons montré que *M. bovis* SB0120 était cultivable au moins cinq mois à une température basse (4°C) avec une mortalité bactérienne minimale et jusqu'à trois mois à 22°C. Ces durées de survie sont supérieures à celles rapportées dans de précédentes études (Fine, Bolin, et al. 2011; Jackson et al. 1995; Duffield & Young 1985). Les sols retrouvés dans l'Auxois ont à la fois des caractéristiques différentes des sols habituellement décrits comme favorables à la survie des mycobactéries (sols sableux à pH acide), et des caractéristiques communes : leur richesse en matière organique et en fer. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence un effet de la nature du sol dans notre étude sur la survie de *M. bovis*, il nous paraît probable que les sols argilo-limoneux pérennisent la maladie dans les vallées de l'Auxois. Notre expérience, limitée par des contraintes techniques liées à l'utilisation du laboratoire de confinement L3 du CHU de Dijon, aurait nécessité l'utilisation d'un plus grand nombre de sols, de points de prélèvements et de répétitions biologiques. La concentration des foyers bovins (notamment des recontaminations de cheptels) dans une zone limitée du département en Auxois interroge également sur le rôle du contexte paysager et géomorphologique commun des pâtures suspectes dans la survie de *M. bovis*.

Ces durées de survie de *M. bovis* dans les sols doivent être considérées avec précaution car obtenues dans des conditions expérimentales contrôlées qui ne miment que partiellement les conditions environnementales réelles (sols débarrassées de leur flore endogène, à une température d'incubation constante, une humidité optimale et une protection contre les UV). Il est probable qu'en conditions naturelles, la survie de *M. bovis* soit moins longue à cause des variations nyctémérales de températures, des variations des précipitations, des UV ainsi que de l'effet barrière potentiel de la flore endogène des matrices environnementales. La corrélation de ces données avec les courbes de

températures permettent de montrer que la période de novembre à avril, où les températures sont les plus basses, est compatible avec une survie optimale de *M. bovis* dans les sols.

Les résultats obtenus dans notre étude de survie ont soulevé la question de la persistance de *M. bovis* dans le sol dans un état viable mais non cultivable (VNC), puisque la bactérie n'est plus cultivable mais toujours détectée par qPCR. L'état VNC de *M. bovis* a déjà été suggéré dans des études de survie dans du sol (Adams et al. 2013; Young et al. 2005). Les mycobactéries possèdent une capacité particulière à s'adapter et à survivre dans des conditions défavorables, en l'absence de nutriments, d'oxygène, sous différents stress exogènes, notamment dans les phagosomes de l'hôte pour les mycobactéries pathogènes (Gengenbacher & Kaufmann 2012; Boon & Dick 2012; Voskuil et al. 2003). Les mycobactéries disposent de différents systèmes à deux composants (permettant une transduction de signal) leur permettant la perception sensorielle des conditions environnementales et en particulier de la composition du milieu extracellulaire (Cook et al. 2009; Cole et al. 1998). Dans les substrats environnementaux, la bactérie conserve probablement tout son potentiel de perception du milieu qui l'entoure et ses capacités d'adaptation mais elle ne peut pas interagir avec lui comme avec les cellules de l'hôte. A l'heure actuelle, les mécanismes d'adaptation mis en jeu par *M. bovis* pour survivre lors de son excrétion par l'hôte dans l'environnement sont inconnus.

Nous avons montré pour la première fois que les lombrics, véritables ingénieurs du sol, ont la capacité de disséminer la bactérie dans leur environnement par le biais des tunnels qu'ils creusent et des turricules qu'ils émettent à et sous la surface du sol. L'enfouissement de la bactérie à quelques centimètres sous le sol favorise probablement sa survie. Les lombrics peuvent également jouer un rôle de vecteur quand ils portent du sol contaminé dans leur tube digestif et qu'ils sont ingérés par des blaireaux ou des sangliers. Cette étude soulève la problématique du rôle de la faune du sol dans la survie et la circulation de *M. bovis* dans l'environnement et le risque que des réservoirs cachés de la bactérie entretiennent à bas bruit une contamination de l'environnement.

Perspectives

L'évaluation de la contamination environnementale réalisée en Côte d'Or et dans une moindre mesure en Charente (terriers de blaireaux uniquement) n'est pas extrapolable aux autres régions françaises touchées par la tuberculose. A ce jour, aucune investigation environnementale aussi complète n'a été menée dans des départements fortement infectés comme la Dordogne et les Pyrénées Atlantiques où bovins et faune sauvage cohabitent. Il serait donc intéressant d'évaluer le niveau de contamination environnementale des zones partagées par les bovins et la faune sauvage afin de vérifier si les zones humides et les terriers sont également à risque dans ces départements. De plus, les résultats obtenus dans la zone endémique de Côte d'Or ont suggéré le rôle possible du contexte géomorphologique, hydrologique et pédologique de l'Auxois dans la contamination environnementale et la persistance de *M. bovis*. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer le contexte des pâtures suspectes de l'Auxois avec les pâtures suspectes des départements les plus touchés par la tuberculose bovine. La caractérisation physico-chimique du sol de ces pâtures permettrait peut-être de mettre en relation d'éventuelles propriétés communes entre les sols incriminés et la persistance de la bactérie. La mise en évidence de facteurs de risque paysagers, hydrographiques et/ou pédologiques permettrait éventuellement de mettre au point un outil de prévision des risques en fonction du contexte rencontré (pâtures à risque), d'adapter au mieux la gestion sanitaire et d'améliorer la biosécurité dans les élevages. Si le rôle des zones humides («mouilles») et des sources dans d'autres régions est confirmé, il conviendra de limiter l'accès des bovins à ces zones pour limiter la contamination. En Côte d'Or, des approches de ce type (drainage et clôture des zones humides) pour empêcher l'accès des animaux sont en cours, en collaboration avec les éleveurs, les agences de bassin, l'ONEMA ainsi que les gestionnaires des zones humides à l'échelle du bassin versant de la Brenne.

La durée de survie démontrée de *M. bovis* dans les sols remet partiellement en cause la durée du délai de carence de 2 mois avant réinstallation d'animaux suite à la période de vide sanitaire dans les exploitations qui ont été foyer de tuberculose. Nos observations devront être discutées dans le cadre de l'optimisation de ces pratiques.

Sur le plan expérimental, notre expérience de survie sur deux sols étant insuffisante, une étude de la survie de *M. bovis* sur un grand nombre de sols aux caractéristiques physico-chimiques contrastées permettrait d'identifier les facteurs physico-chimiques du sol associés à une survie optimale de la bactérie, comme cela a pu être fait au sein de notre équipe pour *Listeria monocytogenes* (Locatelli et al. 2013). L'identification des facteurs édaphiques favorisant la persistance de *M. bovis* permettra de mettre en évidence les sols à risque.

La recherche de *M. bovis* dans des matrices environnementales se heurte aux limites des techniques utilisées. Concernant la qPCR, bien qu'elle reste une technique de choix, des efforts sont encore nécessaires pour abaisser les seuils de détection dans les matrices complexes faiblement

chargées en mycobactéries. D'autres techniques PCR pourraient être envisagées, notamment la PCR digitale (ou PCR numérique) qui permet de gagner en sensibilité et de limiter l'impact des inhibiteurs, mais dont l'utilisation est encore limitée par le coût. De plus, la qPCR détecte l'ADN bactérien sans donner aucune indication sur la viabilité de la cellule. Devant les difficultés à isoler *M. bovis* par la culture à partir de matrices environnementales complexes, à cause notamment de sa croissance très lente, une approche transcriptomique permettrait de préciser l'état viable de *M. bovis*. Cette approche pourrait également apporter des connaissances encore totalement inconnues à l'heure actuelle sur les mécanismes de survie mis en jeu par la bactérie une fois excrétée par son hôte dans l'environnement et mettre en évidence les gènes impliqués dans son adaptation aux conditions environnementales et donc sa persistance. Dans l'objectif d'éclaircir ces mécanismes qui semblent fondamentaux pour la compréhension de l'adaptation et de la survie de *M. bovis* dans l'environnement, l'utilisation d'une approche transcriptomique permettrait d'identifier les modifications transcriptionnelles à l'échelle du génome complet par une approche de séquençage des ARN (RNA seq) et de certains gènes par RT-PCR lors de l'introduction de *M. bovis* dans le sol. La comparaison de ces données avec les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* dans différentes conditions de stress (Rodriguez et al. 2008; Jang et al. 2009) permettraient de vérifier si les mêmes mécanismes sont impliqués. Les gènes du régulon de la dormance présents chez *M. bovis* sont surexprimés dans les macrophages *in vitro* et *in vivo* (Rodriguez et al. 2008), il serait particulièrement intéressant d'évaluer leur niveau d'expression lors de l'introduction de la bactérie dans le sol. Comme il est délicat d'extraire l'ARN de matrices complexes comme le sol, l'utilisation d'extraits aqueux de sol pourrait faciliter l'étude (Piveteau et al. 2011). Pour aller plus loin, il serait intéressant de comparer les transcriptomes de *M. bovis* lorsque les conditions abiotiques (type de sol, température, humidité, etc.) et biotiques (comparaison absence/présence du microbiote endogène du sol) varient, pour cerner plus finement les mécanismes d'adaptation déployés face aux différents stress.

Les méthodes de culture de *M. bovis* à partir de matrices environnementales complexes comme le sol sont encore à améliorer. L'isolement de souches environnementales de *M. bovis* permettrait grâce aux nouvelles techniques de séquençage (NGS) de faire de la génomique comparative sur génome complet avec les mêmes souches isolées chez les animaux et d'améliorer les connaissances sur les mécanismes génétiques mis en jeu dans l'adaptation et la persistance de la bactérie dans l'environnement.

Concernant la faune, la persistance et la circulation des mycobactéries dans l'eau et le sol pourraient être favorisées par la micro- et la mésofaune présentes dans ces matrices. Les protozoaires et particulièrement les amibes ont fait l'objet d'études montrant la survie dans leurs trophozoïtes et leurs cystes de nombreuses espèces, dont *M. bovis* (Taylor et al. 2003; Mba Medie et al. 2011). Dans notre étude, un des échantillons de nématodes prélevé dans les sédiments d'une source a donné un

signal moléculaire révélant un lien potentiel entre nématodes et persistance des mycobactéries. Pour des raisons de temps et de compétences, nous n'avons pas exploré minutieusement ces éventuels réservoirs cachés de *M. bovis*. Devant l'abondance et la diversité de ces animaux dans les matrices que nous analysons, des recherches complémentaires nous semblent nécessaires pour préciser leur rôle potentiel dans la persistance de *M. bovis*.

Les différents résultats obtenus pendant ce travail et les implications qui en ressortent ont été régulièrement partagés avec les instances sanitaires et agricoles de Côte d'Or, afin d'enrichir les connaissances sur l'épidémiologie très complexe de cette maladie et de participer à l'amélioration des mesures de biosécurité qui en découlent. D'autres départements touchés par la tuberculose bovine, intéressés par nos travaux, nous ont fait parvenir des demandes d'analyse environnementale dans des zones où la transmission indirecte de la maladie est fortement suspectée.

Les deux protocoles innovants, pour l'extraction des mycobactéries du sol et le suivi de leur croissance en milieu liquide, développés dans ce travail de thèse font l'objet d'une étude de valorisation (protection intellectuelle et étude de marché) en collaboration avec la SATT Grand Est.

Enfin, les différentes idées et perspectives développées dans cette thèse ont été reprises en partie dans le cadre de l'appel d'offre Horizon 2020 à travers le dépôt d'un projet européen multipartenaire (scientifiques et entreprises) qui est coordonné par l'INRA de Tours Nouzilly et qui implique de nombreux partenaires en Allemagne (Lionex PME spécialisée dans les outils de détection sérologique spécifiques), en Hollande (WUR), en UK (APHA), en Irlande (UCD), en Italie (Université de Naples). Ce projet intitulé DEPICT vise, entre autre, à une meilleure compréhension des mécanismes infectieux, de la réaction inflammatoire et immunologique des animaux, mais également à déterminer le rôle de l'environnement dans la survie des pathogènes comme *M. bovis* et Map, entre autres. La diversité et la persistance de *M. bovis* et Map seront étudiées dans l'environnement afin de déterminer les facteurs influençant la survie de ces pathogènes en particulier dans les sols. Au travers de ce programme, et d'autres collaborations à venir avec l'INRA de Tours, le travail débuté au cours de cette thèse sur *M. bovis* sera élargi à Map, mycobactérie également difficilement cultivable, et revêtant une grande importance pour la santé animale et la santé humaine (elle serait impliquée dans la maladie de Crohn). Les nouveaux outils (culture et détection) développés au cours de cette thèse seront testés sur Map pour permettre l'isolement d'un plus grand nombre de souches environnementales.

Une des questions en suspens reste la démonstration de la contamination de bovins à partir de *M. bovis* présente dans des matrices environnementales. Des expériences de contamination expérimentale en animalerie P3 à partir de sol ou d'eau contaminés pourraient permettre cette démonstration. L'utilisation du modèle cobaye, espèce très sensible à l'infection par *M. bovis*, pour réaliser des expériences préliminaires pourrait être envisagée avant de concevoir des expériences sur bovins. Bien que ce modèle animal soit assez éloigné du modèle bovin en ce qui concerne l'étude de la

transmission indirecte de *M. bovis* (les cobayes génèrent par exemple beaucoup moins d'aérosols que les bovins quand ils boivent et ils ne ruminent pas), il constitue un modèle plus facilement manipulable et moins coûteux. Il permettrait d'affiner les données sur les voies de transmission environnementales potentielles, avant de passer sur un modèle bovin, beaucoup plus contraignant de par la taille des animaux et plus coûteux.

Références bibliographiques

- Acevedo-Whitehouse, K., Vicente, J., Gortázar, C., Höfle, U., Fernández-de-Mera, I.G., Amos, W.,** 2005. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol. Ecol.* 14, 3209–17.
- Adams, A.P., Bolin, S.R., Fine, A.E., Bolin, C.A., Kaneene, J.B.,** 2013. Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6501–6506.
- Adekambi, T., Ben Salah, S., Khlif, M., Raoult, D., Drancourt, M.,** 2006. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5974–5981.
- Adékambi, T., Drancourt, M.,** 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2095–105.
- Aimé, B., Lequen, L., Balageas, A., Haddad, N., Maugein, J.,** 2012. *M. bovis* and *M. caprae* infections in Aquitaine: A clinico-epidemiologic study of 15 patients. *Pathol. Biol. (Paris)*. 60, 156–159.
- Alexander, K. A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D., Warren, R.M., van Pittius, N.C.G.,** 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. Mungi*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1296–1299.
- 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, 1951–1962.
- Álvarez, A.H., Estrada-Chávez, C., Flores-Valdez, M.A.,** 2009. Molecular findings and approaches spotlighting *Mycobacterium bovis* persistence in cattle. *Vet. Res.* 40, 1–16.
- Ameni, G., Vordermeier, M., Firdessa, R., Aseffa, A., Hewinson, G., Gordon, S. V., Berg, S.,** 2011. *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. *Vet. J.* 188, 359–361.
- ANSES,** 2011. Tuberculose bovine et faune sauvage. Rapport Avril 2011.
- Antoine, D., Jarlier, V.,** 2010. La tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis* en France. *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* Septembre.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Dominguez, L.,** 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz et al. 1999) to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1785–1789.
- Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, Enrique Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez, L.,** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1263–1273.
- Archuleta, R.J., Yvonne Hoppes, P., Primm, T.P.,** 2005. *Mycobacterium avium* enters a state of metabolic dormancy in response to starvation. *Tuberculosis (Edinb)*. 85, 147–58.
- Aronson, T., Holtzman, A., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Berlin, O.G.W., Hill, H., Stelma, G., J.,** 1999. Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1008–1012.
- Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I.,** 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 924–937.
- Ballesteros, C., Garrido, J.M., Vicente, J., Romero, B., Galindo, R.C., Minguijón, E., Villar, M., Martín-Hernando,**

- M.P., Sevilla, I., Juste, R., Aranaz, A., de la Fuente, J., Gortázar, C.,** 2009. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine* 27, 6662–6668.
- Barasona, J.A., Latham, M.C., Acevedo, P., Armenteros, J.A., Latham, A.D.M., Gortazar, C., Carro, F., Soriguer, R.C., Vicente, J.,** 2014. Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: Implications for cross-species disease transmission. *Vet. Res.* 45, 1–11.
- Barasona, J.A., Torres, M.J., Aznar, J., Gortázar, C., Vicente, J.,** 2015. DNA detection reveals *Mycobacterium tuberculosis* complex shedding routes in its wildlife reservoir the Eurasian wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* (December). doi:10.1111/tbed.12458
- Barker, J., Brown, M.R.W.,** 1994. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140, 1253–1259.
- Baubet, E., Ropert-Coudert, Y., Brandt, S.,** 2003. Seasonal and annual variations in earthworm consumption by wild boar (*Sus scrofa scrofa* L.). *Wildl. Res.* 30, 179.
- Ben Salah, I., Drancourt, M.,** 2010. Surviving within the amoebal exocyst: the *Mycobacterium avium* complex paradigm. *BMC Microbiol.* 10, 99.
- Bénet, J., Boschioli, M.L., Dufour, B., Garin-Bastuji, B.,** 2006. Lutte contre la tuberculose bovine en France de 1954 à 2005 : analyse de la pertinence épidémiologique de l'évolution de la réglementation. *Epidémiologie santé Anim.* 50, 127–143.
- Benham, P.F.,** 1985. The behaviour of badgers and cattle and some factors that affect the chance of contact between the species. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 14, 390–391.
- Benham, P.F., Broom, D.M.,** 1989. Interactions between cattle and badgers at pasture with reference to bovine tuberculosis transmission. *Br. Vet. J.* 145, 226–241.
- Bercovier, H., Kafri, O., Sela, S.,** 1986. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 1136–1141.
- Berg, S., Garcia-Pelayo, M.C., Müller, B., Hailu, E., Asimwe, B., Kremer, K., Dale, J., Boniotti, M.B., Rodriguez, S., Hilty, M., Rigouts, L., Firdessa, R., MacHado, A., Mucavele, C., Ngandolo, B.N.R., Bruchfeld, J., Boschioli, M.L., Müller, A., Sahraoui, N., Pacciarini, M., Cadmus, S.I., Joloba, M., Van Soelingen, D., Michel, A.L., Djønne, B., Aranaz, A., Zinsstag, J., Van Helden, P., Portaels, F., Kazwala, R., Källenius, G., Hewinson, R.G., Aseffa, A., Gordon, S. V., Smith, N.H.,** 2011. African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. *J. Bacteriol.* 193, 670–678.
- Bermingham, M.L., Bishop, S.C., Woolliams, J.A., Pong-Wong, R., Allen, A.R., McBride, S.H., Ryder, J.J., Wright, D.M., Skuce, R.A., McDowell, S.W., Glass, E.J.,** 2014. Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity (Edinb).* 112, 543–551.
- Beširović, H., Alić, A., Špičić, S., Cvetnić, Ž., Prašović, S., Velić, L.,** 2012. Bovine tuberculosis in Bosnia and Herzegovina caused by *Mycobacterium caprae*. *Vet. Arh.* 82, 341–349.
- Beumer, A., King, D., Donohue, M., Mistry, J., Covert, T., Pfaller, S.,** 2010. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in drinking water and biofilms by quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7367–7370.
- Biek, R., O'Hare, A., Wright, D., Mallon, T., McCormick, C., Orton, R.J., McDowell, S., Trewby, H., Skuce, R.A., Kao, R.R.,** 2012. Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of *Mycobacterium bovis* in sympatric cattle and badger populations. *PLoS Pathog.* 8, e1003008.
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A.,** 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and

- Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res.36, 411-436.
- Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bougnoux, M.-E., Beretti, J.-L., Lotz, A., Suarez, S., Meyer, J., Join-Lambert, O., Descamps, P., Grall, N., Mory, F., Dubreuil, L., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A.,** 2012. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. Clin Microbiol Infect 18, 1117–1125.
- Biswas, S., Rolain, J.M.,** 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. J. Microbiol. Methods 92, 14–24.
- Blackwood, K.S., He, C., Gunton, J., Turenne, C.Y., Wolfe, J., Kabani, A. M.,** 2000. Evaluation of recA sequences for identification of *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol. 38, 2846–2852.
- Bland, C.S., Ireland, J.M., Lozano, E., Alvarez, M.E., Primm, T.P.,** 2005. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5719–5727.
- Boadella, M., Barasona, J.A., Diaz-Sanchez, S., Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Gortázar, C.,** 2012. Performance of immunochromatographic and ELISA tests for detecting fallow deer infected with *Mycobacterium bovis*. Prev. Vet. Med. 104, 160–164.
- Boadella, M., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Esfandiari, J., Jaroso, R., Carta, T., Garrido, J.M., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C.,** 2011. Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). J. Vet. Diagnostic Investig. 23, 77–83.
- Böddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blöcker, H., Böttger, E.C.,** 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. 28, 1751–1759.
- Böhm, M., Hutchings, M.R., White, P.C.L.,** 2009. Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. PLoS One 4, e5016.
- Bollo, E., Guarda, F., Capucchio, M.T., Galietti, F.,** 1998. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *M. avium* Complex in tissue specimens from cattle through identification of specific rRNA sequences. J. Vet. Med. 45, 395–400.
- Boniotti, M.B., Gorla, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zaroni, M., Zoppi, S., Dondo, A., Tagliabue, S., Bonora, S., Zanardi, G., Pacciarini, M.L.,** 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, 636–644.
- Boon, C., Dick, T.,** 2012. How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later. Future Microbiol. 7, 513–518.
- Boon, C., Dick, T.,** 2002. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. J. Bacteriol. 184, 6760–6767.
- Boon, C., Li, R., Qi, R., Dick, T.,** 2001. Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. J. Bacteriol. 183, 2672–2676.
- Boulahbal, F., Robert, J., Trystram, D., Benoist, A. C., Vincent, V., Jarlier, V.,** 1998. La tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis* en France durant l’année 1995. Bull. épidémiologique Hebd. 48.
- Boyard, C., Vourc’h, G., Barnouin, J.,** 2008. The relationships between *Ixodes ricinus* and small mammal species at the woodland-pasture interface. Exp. Appl. Acarol. 44, 61–76.
- Brennan, P.J., Nikaido, H.,** 1995. The envelope of mycobacteria. Annu. Rev. Biochem. 64, 29–63.

- Brodin, P., Eiglmeier, K., Marmiesse, M., Billault, A., Garnier, T., Niemann, S., Cole, S.T., Brosch, R.,** 2002. Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect.* 70, 5568–5578.
- Brook, R.K., McLachlan, S.M.,** 2009. Transdisciplinary habitat models for elk and cattle as a proxy for bovine tuberculosis transmission risk. *Prev. Vet. Med.* 91, 197–208.
- Brook, R.K., Wal, E. Vander, van Beest, F.M., McLachlan, S.M.,** 2012. Evaluating use of cattle winter feeding areas by elk and white-tailed deer: Implications for managing bovine tuberculosis transmission risk from the ground up. *Prev. Vet. Med.* 1–11.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.,** 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3684–3689.
- Brosch, R., Gordon, S. V, Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos Santos, S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J.K., Golby, P., Garcia, J.N., Hewinson, R.G., Behr, M. A, Quail, M. A, Churcher, C., Barrell, B.G., Parkhill, J., Cole, S.T.,** 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5596–5601.
- Brotherstone, S., White, I.M.S., Coffey, M., Downs, S.H., Mitchell, A.P., Clifton-Hadley, R.S., More, S.J., Good, M., Woolliams, J.A.,** 2010. Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *J. Dairy Sci.* 93, 1234–1242.
- Broughan, J.M., Crawshaw, T.R., Downs, S.H., Brewer, J., Clifton-Hadley, R.S.,** 2013a. *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 2: A review of diagnostic methods. *Vet. J.* 198, 346–351.
- Broughan, J.M., Downs, S.H., Crawshaw, T.R., Upton, P.A., Brewer, J., Clifton-Hadley, R.S.,** 2013b. *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 1: Review of epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004–2010. *Vet. J.* 198, 339–345.
- Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G.,** 2011. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 151, 14–22.
- Butler, W.R., Guthertz, L.S.,** 2001. Mycolic acid analysis by High-Performance Liquid Chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 704–726.
- Cadmus, S.I., Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., van Soolingen, D.,** 2009a. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 2066–2067.
- Cadmus, S.I., Jenkins, A.O., Godfroid, J., Osinusi, K., Adewole, I.F., Murphy, R.L., Taiwo, B.O.,** 2009b. *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium africanum* in stools from children attending an immunization clinic in Ibadan, Nigeria. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 740–744.
- Cadmus, S.I., Palmer, S., Okker, M., Dale, J., Gover, K., Smith, N., Jahans, K., Hewinson, R.G., Gordon, S. V,** 2006. Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* 44, 29–34.
- Cadmus, S.I., Yakubu, M.K., Magaji, A.A., Jenkins, A.O., van Soolingen, D.,** 2010. *Mycobacterium bovis*, but also *M. africanum* present in raw milk of pastoral cattle in north-central Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1047–1048.
- Cambau, E., Lamaitre, N., Sougakoff, W., Jarlier, V.,** 2003. Résistance aux antituberculeux. *Antibiotiques* 5, 29–37.

- Carbonnelle, B., Dailloux, M., Lebrun, L., Maugein, J., Pernot, C., 2003.** Cahier de biologie médicale N°29. Mycobactéries, mycobactérioses.
- Carrasco-Garcia, R., Barasona, J.A., Gort, Montoro, V., Sanchez-Vizcaino, J.M., Vicente, J., 2015.** Wildlife and livestock use of extensive farm resources in South Central Spain: implications for disease transmission. *Eur. J. Wildl. Res.* 62(1), 65-78.
- Cassidy, J.P., 2006.** The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet. Microbiol.* 112, 151–161.
- Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Pollock, J.M., Evans, R.T., Forster, F., Neill, S.D., 1999.** Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *J. Comp. Pathol.* 121, 321–37.
- Castets, M., Sarrat, H., 1968.** Bacteriologic aspects of mycobacteria isolated at Dakar in 1967. *Bull. Soc. Med. Afr. Noire Lang. Fr.* 13, 463–469.
- Cavalerie, L., Courcoul, A., Boschioli, M.L., Réveillaud, E., Gay, P., 2014.** Tuberculose bovine en France en 2014 : une situation stable. *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* 4–11.
- Cha, D., Cheng, D., Liu, M., Zeng, Z., Hu, X., Guan, W., 2009.** Analysis of fatty acids in sputum from patients with pulmonary tuberculosis using gas chromatography-mass spectrometry preceded by solid-phase microextraction and post-derivatization on the fiber. *J. Chromatogr. A* 1216, 1450–1457.
- Chapinal, N., Elkin, B.T., Joly, D.O., Schumaker, B.A., Stephen, C., 2012.** Agreement between the caudal fold test and serological tests for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in bison. *Prev. Vet. Med.* 105, 326–330.
- Ciliberti, A., Gavier-Widén, D., Yon, L., Hutchings, M.R., Artois, M., 2015.** Prioritisation of wildlife pathogens to be targeted in European surveillance programmes: Expert-based risk analysis focus on ruminants. *Prev. Vet. Med.* 118, 271–284.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E., 1997.** Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* 65, 3759–3767.
- Cleary, G.P., Corner, L.A.L., O’Keeffe, J., Marples, N.M., 2011.** Diet of the European badger (*Meles meles*) in the Republic of Ireland: A comparison of results from an analysis of stomach contents and rectal faeces. *Mamm. Biol.* 76, 470–475.
- Clifton-Hadley, R.S., Wilesmith, J.W., Stuart, F. A, 1993.** *Mycobacterium bovis* in the European badger (*Meles meles*): epidemiological findings in tuberculous badgers from a naturally infected population. *Epidemiol. Infect.* 111, 9–19.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V, Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 396, 190.
- Coleman, J.D., Cooke, M.M., 2001.** *Mycobacterium bovis* infection in wildlife in New Zealand. *Tuberculosis (Edinb).* 81, 191–202.
- Collins, C.H., Grange, J.M., 1983.** The bovine tubercle bacillus. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 13–29.
- Cooper, S.M., Scott, H.M., de la Garza, G.R., Deck, A.L., Cathey, J.C., 2010.** Distribution and interspecies contact of feral Swine and cattle on rangeland in South Texas: implications for disease transmission. *J. Wildl. Dis.* 46, 152–164.

- Corner, L.A.L.**, 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet. Microbiol.* 112, 303–312.
- Corner, L.A.L., Costello, E., Lesellier, S., O’Meara, D., Sleeman, D.P., Gormley, E.**, 2007. Experimental tuberculosis in the European badger (*Meles meles*) after endobronchial inoculation of *Mycobacterium bovis*: I. Pathology and bacteriology. *Res. Vet. Sci.* 83, 53–62.
- Corner, L.A.L., Murphy, D., Gormley, E.**, 2011. *Mycobacterium bovis* infection in the Eurasian badger (*Meles meles*): the disease, pathogenesis, epidemiology and control. *J. Comp. Pathol.* 144, 1–24.
- Corner, L.A.L., O’Meara, D., Costello, E., Lesellier, S., Gormley, E.**, 2012. The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *Vet. J.* 194, 166–172.
- Coscolla, M., Gagneux, S.**, 2014. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin. Immunol.* 26, 431–444.
- Coscolla, M., Lewin, A., Metzger, S., Maetz-Rensing, K., Calvignac-Spencer, S., Nitsche, A., Dabrowski, P.W., Radonic, A., Niemann, S., Parkhill, J., Couacy-Hymann, E., Feldman, J., Comas, I., Boesch, C., Gagneux, S., Leendertz, F.H.**, 2013. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 969–976.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R. A, Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X.**, 1999. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 59–70.
- Coulombe, F., Divangahi, M., Veyrier, F., de Léséleuc, L., Gleason, J.L., Yang, Y., Kelliher, M.A., Pandey, A.K., Sasseti, C.M., Reed, M.B., Behr, M.**, 2009. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J. Exp. Med.* 206, 1709–1716.
- Courcou, A., Moyen, J.-L., Brugère, L., Faye, S., Hénault, S., Gares, H., Boschioli, M.L.**, 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, e90334.
- Courtenay, O., Reilly, L. A, Sweeney, F.P., Hibberd, V., Bryan, S., Ul-Hassan, A., Newman, C., Macdonald, D.W., Delahay, R.J., Wilson, G.J., Wellington, E.M.H.**, 2006. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biol. Lett.* 2, 460–462.
- Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumarraga, M., Bernardelli, A.**, 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1305–1314.
- 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. *EuroReference Cahier num.* 12.
- Cowie, C.E., Hutchings, M.R., Barasona, J.A., Gortázar, C., Vicente, J., White, P.C.L.**, 2015. Interactions between four species in a complex wildlife: livestock disease community: implications for *Mycobacterium bovis* maintenance and transmission. *Eur. J. Wildl. Res.* 62(1), 51-64.
- Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Sostaric, B., Spicic, S., Obrovac, M., Marjanovic, S., Benic, M., Kirin, B.K., Vickovic, I.**, 2007. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11, 652–658.
- Dale, J.W., Brittain, D., Cataldi, A.A., Cousins, D., Crawford, J.T., Driscoll, J., Heersma, H., Lillebaek, T., Quitugua, T., Rastogi, N., Skuce, R.A., Sola, C., Van Soolingen, D., Vincent, V.**, 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: Recommendations for standardised nomenclature.

- Int. J. Tuberc. Lung Dis. 5, 216–219.
- Dalley, D., Davé, D., Lesellier, S., Palmer, S., Crawshaw, T., Hewinson, R.G., Chambers, M.,** 2008. Development and evaluation of a gamma-interferon assay for tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Tuberculosis* 88, 235–243.
- Danelishvili, L., Wu, M., Stang, B., Harriff, M., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., Bildfell, R., Arbogast, B., Bermudez, L.E.,** 2007. Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11038–11043.
- Dang, N.A., Kuijper, S., Walters, E., Claassens, M., van Soolingen, D., Vivo-Truyols, G., Janssen, H.-G., Kolk, A.H.J.,** 2013. Validation of biomarkers for distinguishing *Mycobacterium tuberculosis* from non-tuberculous mycobacteria using gas chromatography-mass spectrometry and chemometrics. *PLoS One* 8, e76263.
- Daniel, T.M.,** 2006. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* 100, 1862–1870.
- David, H., Levy Frebaut, U., Thorel, M.F.,** 1989. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique, Institut Pasteur, p. 35-36.
- Dawson, K.L., Bell, A., Kawakami, R.P., Coley, K., Yates, G., Collins, D.M.,** 2012. Transmission of *Mycobacterium orygis* (*M. tuberculosis* complex species) from a tuberculosis patient to a dairy cow in New Zealand. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3136–3138.
- de Jong, B.C., Antonio, M., Gagneux, S.,** 2010. *Mycobacterium africanum*-review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4.(9), e744.
- de la Rúa-Domenech, R.,** 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 86, 77–109.
- de la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S.,** 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 190–210.
- Dean, G.S., Rhodes, S.G., Coad, M., Adam, O., Cockle, P.J., Clifford, D.J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M.,** 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 73, 6467–6471.
- Delahay, R.J., Cheeseman, C.L., Clifton-Hadley, R.S.,** 2001. Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. *Tuberculosis (Edinb).* 81, 43–49.
- Delahay, R.J., De Leeuw, A.N.S., Barlow, A.M., Clifton-Hadley, R.S., Cheeseman, C.L.,** 2002. The status of *Mycobacterium bovis* Infection in UK Wild Mammals: A Review. *Vet. J.* 164, 90–105.
- Delahay, R.J., Langton, S., Smith, G.C., Clifton-Hadley, R.S., Cheeseman, C.L.,** 2000. The spatio-temporal distribution of *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in a high-density badger population. *J. Anim. Ecol.* 69, 428–441.
- Delahay, R.J., Walker, N., Smith, G., Wilkinson, D., Clifton-Hadley, R., Cheeseman, C., Tomlinson, A., Chambers, M.,** 2013. Long-term temporal trends and estimated transmission rates for *Mycobacterium bovis* infection in an undisturbed high-density badger (*Meles meles*) population. *Epidemiol. Infect.* 141, 1445–1456.
- Delaune, D., Janvier, F., Rapp, C., Gérôme, 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. (Paris).* 70, 231–236.
- Desikan, S., Narayanan, S.,** 2015. Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J. Med. Res.* 141, 761–774.

- Desmond, E., Ahmed, A.T., Probert, W.S., Ely, J., Jang, Y., Sanders, C. A., Lin, S.Y., Flood, J.,** 2004. *Mycobacterium africanum* Cases, California. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 921–923.
- Dewes, H.F.,** 1996. The rate of soil ingestion by dairy cows and the effect on available copper, calcium, sodium and magnesium. *N. Z. Vet. J.* 44, 199–200.
- Dick, T., Lee, B.H., Murugasu-Oei, B.,** 1998. Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 159–164.
- Dippenaar, A., Parsons, S.D.C., Sampson, S.L., van der Merwe, R.G., Drewe, J.A., Abdallah, A.M., Siame, K.K., Gey van Pittius, N.C., van Helden, P.D., Pain, A., Warren, R.M.,** 2015. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis.* 95(6), 682–688.
- Djelouadji, Z., Raoult, D., Drancourt, M.,** 2011. Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infect. Dis.* 11, 641–650.
- Dondo, A., Zoppi, S., Rossi, F., Chiavacci, L., Barbaro, A., Garrone, A., Benedetto, A., Gorla, M.,** 2007. Mycobacteriosis in Wild Boar: Results of 2000–2006 Activity in North-Western Italy. *Epidémiologie santé Anim.* 51, 35–42.
- Drancourt, M., Adékambi, T., Raoult, D.,** 2007. Interactions between *Mycobacterium xenopi*, amoeba and human cells. *J. Hosp. Infect.* 65, 138–142.
- Drewe, J.A., O’Connor, H.M., Weber, N., McDonald, R.A., Delahay, R.J.,** 2013. Patterns of direct and indirect contact between cattle and badgers naturally infected with tuberculosis. *Epidemiol. Infect.* 141, 1467–1475.
- Drewe, J.A., Tomlinson, A.J., Walker, N.J., Delahay, R.J.,** 2010. Diagnostic accuracy and optimal use of three tests for tuberculosis in live badgers. *PLoS One* 5, e11196.
- Duffield, B.J., Young, D.A.,** 1985. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Vet. Microbiol.* 10, 193–197.
- Dutau, G.,** 2005. Petite histoire illustrée de la tuberculose. The history of tuberculosis. *Arch. Pediatr.* 12, 88–95.
- Dziadek, J., Sajduda, A., Boruń, M.,** 2001. Specificity of insertion sequence-based PCR assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5, 569–574.
- EFSA,** 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12, 169.
- El Helou, G., Viola, G.M., Hachem, R., Han, X.Y., Raad, I.I.,** 2013. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. *Lancet Infect. Dis.* 13, 166–174.
- El Khéchine, A., Couderc, C., Flaudrops, C., Raoult, D., Drancourt, M.,** 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One* 6, e24720.
- El Khéchine, A., Henry, M., Raoult, D., Drancourt, M.,** 2009. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis. *Microbiology* 155, 2384–2389.
- Elliott, G.N., Hough, R.L., Avery, L.M., Maltin, C. A, Campbell, C.D.,** 2014. Environmental risk factors in the incidence of Johne’s disease. *Crit. Rev. Microbiol.* 7828, 1–20.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M.M., Dale, J., Innes, J.A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R.G., Smith, N.H., Hawkey, P.M., Sonnenberg, P.,** 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369, 1270–1276.

- Fabre, M., Koeck, J.L., Le Flèche, P., Simon, F., Hervé, V., Vergnaud, G., Pourcel, C.,** 2004. High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of "*Mycobacterium canettii*" strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of "M. can. J. Clin. Microbiol. 42, 3248–3255.
- Falkinham, J.O.,** 2016. Nontuberculous mycobacteria: community and nosocomial waterborne opportunistic pathogens. Clin. Microbiol. Newsl. 38, 1–7.
- Falkinham, J.O., Norton, C.D., Mark, W.,** 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1225–1231.
- Fanning, A., Edwards, S.,** 1991. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. Lancet 338, 1253–1255.
- Fediaevsky, A., Bénet, J.-J., Boschioli, M.L., Rivière, J., Hars, J.,** 2012. La tuberculose bovine en France en 2011, poursuite de la réduction du nombre de foyers. Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment. Novembre, 4–12.
- Fediaevsky, A., Courcou, A., Boschioli, M.L., Reveillaud, E.,** 2014. Tuberculose bovine en France: résultats d'une stratégie plus offensive. Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment. 64, 4–11.
- Fediaevsky, A., Courcou, A., Boschioli, M.L., Reveillaud, E.,** 2013. Tuberculose bovine en France: des signaux favorables mais une situation toujours complexe dans certaines zones. Bull. Epidémiologique - Santé Anim. Aliment. 59, 4–10.
- Fetene, T., Kebede, N., Alem, G.,** 2011. Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of Western Gojam, Ethiopia. Zoonoses Public Health 58, 47–53.
- Fifis, T., Corner, L.A.L., Rothel, J.S., Wood, P.R.,** 1994. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. Scand. J. Immunol. 39, 267–274.
- Fine, A.E., Bolin, C.A., Gardiner, J.C., Kaneene, J.B.,** 2011a. A study of the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural weather conditions in Michigan, USA. Vet. Med. Int. 2011, ID 765430, 1-12.
- Fine, A.E., O'Brien, D.J., Winterstein, S.R., Kaneene, J.B.,** 2011b. An effort to isolate *Mycobacterium bovis* from environmental substrates during investigations of bovine tuberculosis transmission sites (cattle farms and wildlife areas) in Michigan, USA. ISRN Vet. Sci. 2011, ID 787181, 1-11.
- Fischer, O.A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., Du Maine, R., Melicharek, I., Bartos, M., Pavlik, I.,** 2003. Earthworms (*Oligochaeta, Lumbricidae*) and mycobacteria. Vet. Microbiol. 91, 325–338.
- Flores Valdez, M.A., Schoolnik, G.K.,** 2010. DosR-regulon genes induction in *Mycobacterium bovis* BCG under aerobic conditions. Tuberculosis (Edinb). 90, 197–200.
- Forrellad, M., Klepp, L., Gioffré, A.,** 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence 4, 3–66.
- Frank, W., Reisinger, E.C., Brandt-Hamerla, W., Schwede, I., Handrick, W.,** 2009. *Mycobacterium microti*-pulmonary tuberculosis in an immunocompetent patient. Wien. Klin. Wochenschr. 121, 282–6.
- Frottier, J., Eliazewicz, M., Arlet, V., Gaudillat, C.,** 1990. Infections caused by *Mycobacterium africanum*. Bull. Acad. Natl. Med. 174, 29–35.
- Gallagher, J., Clifton-Hadley, R.S.,** 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. Res. Vet. Sci. 69, 203–217.

- Gallagher, J., Horwill, D.M.**, 1977. A selective oleic acid albumin agar medium for the cultivation of *Mycobacterium bovis*. *J. Hyg. (Lond)*. 79, 155–160.
- Gallagher, J., Monies, R., Gavier-Widen, M., Rule, B.**, 1998. Role of infected, non-diseased badgers in the pathogenesis of tuberculosis in the badger. *Vet. Rec.* 142, 710–714.
- Garbaccio, S., Macias, A., Shimizu, E., Paolicchi, F., Pezzone, N., Magnano, G., Zapata, L., Abdala, A., Tarabla, H., Peyru, M., Caimi, K., Zumárraga, M., Canal, A., Cataldi, A.**, 2014. Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Virulence* 5, 297–302.
- Garbaccio, S.G., Cataldi, A.**, 2010. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev. Argent. Microbiol.* 42, 247–53.
- Garnett, B.T., Delahay, R.J., Roper, T.J.**, 2002. Use of cattle farm resources by badgers (*Meles meles*) and risk of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) transmission to cattle. *Proc. Biol. Sci.* 269, 1487–1491.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., 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, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S. V., Hewinson, R.G.**, 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7877–7882.
- Gavier-Widen, D., Chambers, M.A., Palmer, N., Newell, D.G., Hewinson, R.G.**, 2001. Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. *Vet. Rec.* 148, 299–304.
- Gavier-Widén, D., Cooke, M.M., Gallagher, J., Chambers, M.A., Gortázar, C.**, 2009. A review of infection of wildlife hosts with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the “no visible lesion” presentation. *N. Z. Vet. J.* 57, 122–131.
- Genov, I.**, 1965. The effects of certain physical and chemical agents on *Mycobacterium tuberculosis*. *Veteriárni Med. Nauk. Sofia* 2, 97–107.
- Gerasimova, A., Kazakov, A.E., Arkin, A.P., Dubchak, I., Gelfand, M.S.**, 2011. Comparative genomics of the dormancy regulons in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 193, 3446–3452.
- Ghodbane, R., Mba Medie, F., Lepidi, H., Nappez, C., Drancourt, M.**, 2014. Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology* 160, 496–501.
- Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M.F., Islam, N.M., Sarkar, S.N., Dasgupta, S., Kirsebom, L.A.**, 2009. Sporulation in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10781–10786.
- Goodchild, A. V., Clifton-Hadley, R.S.**, 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 81, 23–41.
- Gordon, S. V., Heym, B., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S.T.**, 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 145 Pt 4, 881–892.
- Gormley, E.**, 1999. Detection of *Mycobacterium bovis* lymphocyte stimulating antigens in culture filtrates of a recombinant *Mycobacterium smegmatis* cosmid library. *Vaccine* 17, 2792–2801.
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J.D.**, 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam*) assay. *Vet. Microbiol.* 112, 171–179.
- Gortázar, C., Delahay, R.J., McDonald, R.A., Boadella, M., Wilson, G.J., Gavier-Widén, D., Acevedo, P.**, 2012. The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mamm. Rev.* 42, 193–206.
- Gortázar, C., Torres, M.J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., Negro, J.J., Aznar-Martín, J.**

2008. Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: The role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS One* 3(7), e2776.
- Grange, J.M.**, 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb)*. 81, 71–77.
- Grange, J.M., Yates, M.D.**, 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* 40, 137–151.
- Grange, J.M., Yates, M.D.**, 1989. Incidence and nature of human tuberculosis due to *Mycobacterium africanum* in South-East England: 1977-1987. *Epidemiol. Infect.* 103, 127–132.
- Greub, G., Raoult, D.**, 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 413–433.
- Griffin, J.F.T., Rodgers, C.R., Liggett, S., Mackintosh, C.G.**, 2006. Tuberculosis in ruminants: Characteristics of intra-tonsillar *Mycobacterium bovis* infection models in cattle and deer. *Tuberculosis* 86, 404–418.
- Griffin, J.M., Martin, S.W., Thorburn, M.A., Eves, J.A., Hammond, R.F.**, 1996. A case-control study on the association of selected risk factors with the occurrence of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland. *Prev. Vet. Med.* 27, 217–229.
- Guillet-Caruba, C., Martinez, V., Doucet-Populaire, F.**, 2014. The new tools of microbiological diagnosis of tuberculosis. *La Rev. médecine interne* 35, 794–800.
- Gunn-Moore, D.A., McFarland, S.E., Brewer, J.I., Crawshaw, T.R., Clifton-Hadley, R.S., Kovalik, M., Shaw, D.J.**, 2011. Mycobacterial disease in cats in Great Britain: I. Culture results, geographical distribution and clinical presentation of 339 cases. *J. Feline Med. Surg.* 13, 934–944.
- Gunn-Moore, D.A., Jenkins, P.A., Lucke, V.M.**, 1996. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. *Vet. Rec.* 138, 53–58.
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V.**, 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 1(1), e5.
- Haddad, N., Ostyn, A., Karoui, C., Masselot, M., Thorel, M.F., Hughes, S.L., Inwald, J., Hewinson, R.G., Durand, B.**, 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3623–3632.
- Harris, N.B., Payeur, J., Bravo, D., Osorio, R., Stuber, T., Farrell, D., Paulson, D., Treviso, S., Mikolon, A., Rodriguez-Lainz, A., Cernek-Hoskins, S., Rast, R., Ginsberg, M., Kinde, H.**, 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1025–1028.
- Hars, J., Richomme, C., Boschioli, M.L.**, 2010. La tuberculose bovine dans la faune sauvage en France. *Bull. Epidémiologique - Santé Anim. Aliment.* 38, 28–31.
- Hauer, A., Cruz, K. De, Cochard, T., Godreuil, S., Karaoui, C., Henault, S., Bulach, T., Banuls, A., Biet, F., Boschioli, M.L.**, 2015. Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One* 10(2), e 0117103.
- Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K.**, 2002. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468–1473.
- Hennessee, C.T., Seo, J.S., Alvarez, A.M., Li, Q.X.**, 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 378–387.
- Hines, N., Payeur, J.B., Hoffman, L.J.**, 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using

- the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 243–250.
- Hmama, Z., Pena-Diaz, S., Sunil, J., Av-Gay, Y.**, 2015. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol. Rev.* 264, 220–232.
- Hoefsloot, W., Van Ingen, J., Andrejak, C., Ängeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Beylis, N., Boeree, M.J., Cacho, J., Chihota, V., Chimara, E., Churchyard, G., Cias, R., Daza, R., Daley, C.L., Dekhuijzen, P.N.R., Domingo, D., Drobniewski, F., Esteban, J., Fauville-Dufaux, M., Folkvardsen, D.B., Gibbons, N., Gómez-Mampaso, E., Gonzalez, R., Hoffmann, H., Hsueh, P.R., Indra, A., Jagielski, T., Jamieson, F., Jankovic, M., Jong, E., Keane, J., Koh, W.J., Lange, B., Leao, S., Macedo, R., Mannsåker, T., Marras, T.K., Maugein, J., Milburn, H.J., Mlinkó, T., Morcillo, N., Morimoto, K., Papaventsis, D., Palenque, E., Paez-Peña, M., Piersimoni, C., Polanová, M., Rastogi, N., Richter, E., Ruiz-Serrano, M.J., Silva, A., Da Silva, M.P., Simsek, H., Van Soolingen, D., Szabó, N., Thomson, R., Fernandez, T.T., Tortoli, E., Totten, S.E., Tyrrell, G., Vasankari, T., Villar, M., Walkiewicz, R., Winthrop, K.L., Wagner, D.**, 2013. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. *Eur. Respir. J.* 42, 1604–1613.
- Hohn, A., Lowenstein,** 1926. Die Kulture des tuberklebacillus zur diagnose der tuberculose. *Zeut. fur. Bakt. Orig.* 98, 460–477.
- Hongmanee, P., Stender, H., Rasmussen, O.F.**, 2001. Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of Lowenstein-Jensen and Mycobacteria Growth Indicator Tube cultures using peptide nucleic acid prob. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1032–1035.
- Hormisch, D., Brost, I., Kohring, G., Giffhorn, F., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Färber, P.**, 2004. *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov., a Fluoranthene and Aflatoxin B 1 Degrading Bacterium from Contaminated Soil of a Former Coal Gas Plant. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 653–660.
- Huard, R.C., Claudio, L., Lazzarini, D.O., Butler, W.R., Soolingen, D. Van, Ho, J.L.**, 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1637–1650.
- Huard, R.C., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, L.C.O., van Soolingen, D., Cousins, D., Ho, J.L.**, 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 188, 4271–4287.
- Humblet, M.F., Boschioli, M.L., Saegerman, C.**, 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: A stratified approach. *Vet. Res.* 40(5), 1-24.
- Hutchings, M.R., Harris, S.**, 1999. Quantifying the risks of TB infection to cattle posed by badger excreta. *Epidemiol. Infect.* 122, 167–173.
- Hutchings, M.R., Harris, S.**, 1997. Effects of farm management practices on cattle grazing behaviour and the potential for transmission of bovine tuberculosis from badgers to cattle. *Vet. J.* 153, 149–162.
- Hutchings, M.R., Service, K.M., Harris, S.**, 2002. Is population density correlated with faecal and urine scent marking in European badgers (*Meles meles*) in the UK? *Mamm. Biol.* 67, 286–293.
- Hutchings, M.R., Service, K.M., Harris, S.**, 2001. Defecation and urination patterns of badgers *Meles meles* at low density in south west England-. *Acta Theriol. (Warsz)*. 46, 87–96.
- Huws, S.A., McBain, A.J., Gilbert, P.**, 2005. Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J. Appl. Microbiol.* 98, 238–244.
- Idigoras, P., Pérez-Trallero, E., Alcorta, M., Gutiérrez, C., Muñoz-Baroja, I.**, 1995. Rapid detection of tuberculous

- and non-tuberculous mycobacteria by microscopic observation of growth on Middlebrook 7H11 agar. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 6–10.
- Iivanainen, E., Martikainen, P.J., Väänänen, P.K., Vaananen, P.K., Katila, M.,** 1999. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *J. Appl. Microbiol.* 86, 673–681.
- Jackson, R., De Lisle, G.W., Morris, R.S.,** 1995. A study of the environmental survival of *Mycobacterium bovis* on a farm in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 43, 346–352.
- Jahans, K., Palmer, S., Inwald, J., Brown, J., Abayakoon, S.,** 2004. Isolation of *Mycobacterium microti* from a male Charolais-Hereford cross. *Vet. Rec.* 155, 373–374.
- Jalava, K., Jones, J.A., Goodchild, T., Clifton-Hadley, R., Mitchell, A., Story, A., Watson, J.M.,** 2007. No increase in human cases of *Mycobacterium bovis* disease despite resurgence of infections in cattle in the United Kingdom. *Epidemiol. Infect.* 135, 40–45.
- Jenkins, A.O., Cadmus, S.I., Venter, E.H., Pourcel, C., Hauk, Y., Vergnaud, G., Godfroid, J.,** 2011. Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Vet. Microbiol.* 151, 139–147.
- Jenkins, H.E., Morrison, W.I., Cox, D.R., Donnelly, C.A., Johnston, W.T., Bourne, F.J., Clifton-Hadley, R.S., Gettinby, G., McInerney, J.P., Watkins, G.H., Woodroffe, R.,** 2008. The prevalence, distribution and severity of detectable pathological lesions in badgers naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Epidemiol. Infect.* 136, 1350–1361.
- Jensen, K.E.,** 1954. Presence and destruction of tubercle bacilli in sewage. *Bull. World Health Organ.* 10, 171–179.
- Jiménez, B.A., Hinojoza-Loza, E., Flores-Valdez, M.A., Prado-Montes de Oca, E., Allen, K., Estrada-Chávez, C., Herrera-Rodríguez, S., Flores-Fernández, J.M., Martínez-Velázquez, M., Hernández-Gutiérrez, R., Alvarez, A.H.,** 2013. Expression of non-replicating persistence associated genes of *Mycobacterium bovis* in lymph nodes from skin test-reactor cattle. *Microb. Pathog.* 61-62, 23–28.
- Johnson, L., Dean, G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A.,** 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis (Edinb).* 87, 71–76.
- Kaal, E., Kolk, A.H.J., Kuijper, S., Janssen, H.-G.,** 2009. A fast method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 6319–6325.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J.,** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907–914.
- Kaprelyants, A.S., Gottschal, J.C., Kell, D.B.,** 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 271–285.
- Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S.,** 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38(1): 301.
- Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham, J.O., Hruska, K.,** 2009. *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health.* Springer Netherlands, Dordrecht.
- Khan, N.A.,** 2006. *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 564–595.
- Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelits, B., Van Soolingen, D., Koëter, G.,** 2008. Transmission of *Mycobacterium*

- pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 1469–1473.
- King, H.C., Murphy, A., James, P., Travis, E., Porter, D., Hung, Y.-J., Sawyer, J., Cork, J., Delahay, R.J., Gaze, W., Courtenay, O., Wellington, E.M.**, 2015a. The variability and seasonality of the environmental reservoir of *Mycobacterium bovis* shed by wild European badgers. *Sci. Rep.* 5, 12318.
- King, H.C., Murphy, A., James, P., Travis, E., Porter, D., Sawyer, J., Cork, J., Delahay, R.J., Gaze, W., Courtenay, O., Wellington, E.M.**, 2015b. Performance of a non-invasive test for detecting *Mycobacterium bovis* shedding in European badger (*Meles meles*) populations. *J. Clin. Microbiol.* 53(7): 2316-2323.
- Kirchheimer, W.F., Storrs, E.E.**, 1971. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 39, 693–702.
- Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U., Meier, A., Wrede, A., Kiekenbeck, M., Bange, F., Bottger, E.C.**, 1993. Genotypic identification of Mycobacteria by nucleic acid sequence determination : report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2882–2889.
- Kleeberg, H.H.**, 1984. Tuberculose humaine d'origine bovine et santé publique. *Rev. Sci. Tech.* 3, 33–54.
- Koeck, J.L., Fabre, M., Simon, F., Daffé, M., Garnotel, É., Matan, A. B., Gérôme, P., Bernatas, J.J., Buisson, Y., Pourcel, C.**, 2011. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli "*Mycobacterium canettii*" infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1013–1019.
- Krasnow, I., Wayne, L.G.**, 1966. Sputum Digestion. I. The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 352–355.
- Krishna-Prasad, B.N., Gupta, S.K.**, 1978. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr. Sci.* 47, 245–247.
- Kruuk, H.**, 1978. Foraging and spatial organisation of the European badger, *Meles meles* L. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 4, 75–89.
- Kubica, G.P., Dye, W.E., Cohn, M.L., Middlebrook, G.S.D. and D. with N.-A.-L.-C.H. for C. of M.**, 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine—sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 87, 775–779.
- Kubica, T., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S.**, 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Caused One-Third of Human *M. bovis*-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3070–3077.
- Kukielka, E., Barasona, J.A., Cowie, C.E., Drewe, J. a, Gortázar, C., Cotarelo, I., Vicente, J.**, 2013. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Prev. Vet. Med.* 112, 213–221.
- Kulka, K., Hatfull, G., Ojha, A.K.**, 2012. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms. *J. Vis. Exp.* (60), e3820.
- Lamont, E.A., Bannantine, J.P., Armién, A., Ariyakumar, D.S., Sreevatsan, S.**, 2012. Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS One* 7, e30648.
- Laprie, C., Duboy, J., Malik, R., Fyfe, J.**, 2013. Feline cutaneous mycobacteriosis: a review of clinical, pathological and molecular characterization of one case of *Mycobacterium microti* skin infection and nine cases of feline leprosy syndrome from France and New Caledonia. *Vet. Dermatol.* 24(6), 561–9, e133–4.
- Lavania, M., Katoch, K., Sachan, P., Dubey, A., Kapoor, S., Kashyap, M., Chauhan, D.S., Singh, H.B., Sharma, V.D., Jadhav, R.S., Katoch, V.M.**, 2006. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR

- targeting RLEP sequences. *J. Commun. Dis.* 38, 269–273.
- Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., Vincent, V.,** 2002. Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5318–5325.
- Lee, H., Park, H., Cho, S., Bai, G., Kim, S.,** 2000. Species identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the *rpoB* gene. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2966–2971.
- Lefmann, M., Schweickert, B., Buchholz, P., Göbel, U.B., Ulrichs, T., Seiler, P., Theegarten, D., Moter, A.,** 2006. Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3760–3767.
- Lehtola, M.J., Torvinen, E., Miettinen, I.T., Keevil, C.W.,** 2006. Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in potable-water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 848–853.
- Leistikow, R.L., Morton, R.A., Bartek, I.L., Frimpong, I., Wagner, K., Voskuil, M.I.,** 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* dosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *J. Bacteriol.* 192, 1662–1670.
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E.M., Verstraete, W., Springael, D.,** 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 375–388.
- Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V.,** 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12344–12349.
- Libero, G. De, Mori, L.,** 2014. The T-cell response to lipid antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.* 5, 1–9.
- Liébana, E., Aranaz, A., Francis, B., Cousins, D.,** 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 34, 933–938.
- Liébana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J.C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., Dominguez, L.,** 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 33–36.
- Lim, A., Eleuterio, M., Hutter, B., Murugasu-Oei, B., Dick, T.,** 1999. Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 181, 2252–2256.
- Liss, G.M., Wong, L., Kittle, D.C., Simor, A., Naus, M., Martiquet, P., Misener, C.R.,** 1994. Occupational exposure to *Mycobacterium bovis* infection in deer and elk in Ontario. *Can. J. Public Heal.* 85, 326–329.
- Little, T.W., Naylor, P.F., Wilesmith, J.W.,** 1982. Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. *Vet. Rec.* 111, 550–557.
- Lomme, J.R., Thoen, C.O., Himes, E.M., Vinson, J.W., King, R.E.,** 1976. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169, 912–914.
- Lotz, A., Ferroni, A., Beretti, J.-L., Dauphin, B., Carbonnelle, E., Guet-Revillet, H., Veziris, N., Heym, B., Jarlier, V., Gaillard, J.-L., Pierre-Audigier, C., Frapy, E., Berche, P., Nassif, X., Bille, E.,** 2010. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4481–4486.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whitman, W.B.,** 2008. Road map

- of the phylum *Actinobacteria*, Road Map of the phylum Actinobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second Edition, Volume five. Springer Editions.
- Lugton, I.W., Wilson, P.R., Morris, R.S., Nugent, G.**, 1998. Epidemiology and pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection of red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 46, 147–156.
- Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Palmer, M. V, Waters, W.R.**, 2013. Rapid detection of serum antibody by dual-path platform VetTB assay in white-tailed deer infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 907–911.
- Mackintosh, C.G., Qureshi, T., Waldrup, K., Labes, R.E., Dodds, K.G., Griffin, J.F.T.**, 2000. Genetic resistance to experimental infection with *Mycobacterium bovis* in red deer (*Cervus elaphus*). *Infect. Immun.* 68, 1620–1625.
- Maddock, E.C.**, 1936. Experiments on the infectivity for healthy calves of bovine tubercle bacilli discharged in dung upon pasture: Part I. From tubercular calves fed with emulsions of Tubercle bacilli 1934-5. Part II. From tubercular cows passing Tubercle bacilli in their dun. *J. Hyg. (Lond).* 36, 594–601.
- Maddock, E.C.**, 1934. Further studies on the survival time of the bovine tubercle bacillus in soil, soil and dung, in dung and on grass, with experiments on feeding guinea-pigs and calves on grass artificially infected with bovine tubercle bacilli. *J. Hyg. (Lond).* 34, 372–379.
- Maddock, E.C.**, 1933. Studies on the survival time of the bovine tubercle bacillus in soil, soil and dung, in dung and on grass, with experiments on the preliminary treatment of infected organic matter and the cultivation of the organism. *J. Hyg. (Lond).* 33, 103–117.
- Magee, J.G., Ward, A.C.**, 2012. *Mycobacteriaceae*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second Edition, Volume five. Springer Editions.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K., Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K.**, 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* 178, 1274–1282.
- Mardare, C., Delahay, R.J., Dale, J.W.**, 2013. Environmental amoebae do not support the long-term survival of virulent mycobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1388–1394.
- Marrakchi, H., Lanéelle, M.A., Daffé, M.**, 2014. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* 21, 67–85.
- Marri, P.R., Bannantine, J.P., Golding, G.B.**, 2006. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 906–925.
- Martín-Hernando, M.P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J.M., de la Fuente, J., Gort**, 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis* 87, 360–367.
- Mathema, B., Kurepina, N.E., Bifani, P.J., Kreiswirth, B.N.**, 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 658–685.
- Matsuoka, M., Izumi, S., Budiawan, T., Nakata, N., Saeki, K.**, 1999. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J. Lepr.* 71, 61–67.
- Mba Medie, F., Ben Salah, I., Henrissat, B., Raoult, D., Drancourt, M.**, 2011. *Mycobacterium tuberculosis* complex mycobacteria as amoeba-resistant organisms. *PLoS One* 6, e20499.
- McCallan, L., Mcnair, J., Skuce, R.**, 2014. A review of the potential role of cattle slurry in the spread of bovine

tuberculosis 1–48.

- McCorry, T., Whelan, A.O., Welsh, M.D., McNair, J., Walton, E., Bryson, D.G., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Pollock, J.M.**, 2005. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet. Rec.* 157, 613–618.
- McLaughlin, A.M., Gibbons, N., Fitzgibbon, M., Power, J.T., Foley, S.C., Hayes, J.P., Rogers, T., Keane, J.**, 2012. Primary isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* disease: A prospect of concern. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 110–111.
- McNabb, A., Eisler, D., Adie, K., Amos, M., Rodrigues, M., Stephens, G., Black, W.A., Isaac-Renton, J.**, 2004. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3000–3011.
- Mejia, G.I., Castrillon, L., Trujillo, H., Robledo, J. A.**, 1999. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3, 138–142.
- Menzies, F.D., Neill, S.D.**, 2000. Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *Vet. J.* 160, 92–106.
- Meredith, A., Del Pozo, J., Smith, S., Milne, E., Stevenson, K., McLuckie, J.**, 2014. Leprosy in red squirrels in Scotland. *Vet. Rec.* 175, 285–286.
- Michel, A.L., Müller, B., van Helden, P.D.**, 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet. Microbiol.* 140, 371–381.
- Michel, A.L., Venter, L., Espie, I.W., Coetzee, M.L.**, 2003. *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the national zoological gardens of South Africa, 1991-2001. *J. Zoo Wildl. Med.* 34, 364–370.
- Michelet, L., de Cruz, K., Zanella, G., Aaziz, R., Bulach, T., Karoui, C., Hénault, S., Joncour, G., Boschioli, M.L.**, 2015. Infection with *Mycobacterium microti* in animals in France. *J. Clin. Microbiol.* 53, 981–985.
- Mignard, S., Pichat, C., Carret, G.**, 2006. *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1431–1433.
- Miltgen, J., Morillon, M., Koeck, J.-L., Varnerot, A., Briant, J.-F., Nguyen, G., Verrot, D., Bonnet, D., Vincent, V.**, 2002. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1350–1352.
- Miltner, E.C., Bermudez, L.E.**, 2000. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1990–1994.
- Mitscherlich, E., Marth, E.H.**, 2012. Microbial survival in the environment. Bacteria and rickettsiae important in human and animal health, Springer S. ed.
- Momotani, E., Ozaki, H., Hori, M., Yamamoto, S., Kuribayashi, T., Eda, S., Ikegami, M.**, 2012. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in mice. *Springerplus* 1, 1–10.
- Moore, J., Roper, T.**, 2003. Temperature and humidity in badger *Meles meles* setts. *Mamm. Rev.* 33, 308–313.
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R.**, 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 40, 153–177.
- Mostafa, H.M., Kazda, J., Irgens, L.M., Luesse, H.G.**, 1995. Acid-fast bacilli from former leprosy regions in coastal Norway showing PCR positivity for *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr. other Mycobact. Dis.* 63, 97–99.
- Mukhopadhyay, S., Nair, S., Ghosh, S.**, 2012. Pathogenesis in tuberculosis: Transcriptomic approaches to

- unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 463–485.
- Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J., Laise, C.J.M., Parsons, S.D.C., van Helden, P.D., Zinsstag, J.,** 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis* –induced tuberculosis in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 899–908.
- Müller, B., Hilty, M., Berg, S., Garcia-Pelayo, M.C., Dale, J., Boschirolì, M.L., Cadmus, S.I., Ngandolo, B.N.R., Godreuil, S., Diguimbaye-Djaibé, C., Kazwala, R., Bonfoh, B., Njanpop-Lafourcade, B.M., Sahraoui, N., Guetarni, D., Aseffa, A., Mekonnen, M.H., Razanamparany, V.R., Ramarokoto, H., Djonne, B., Oloya, J., Machado, A., Mucavele, C., Skjerve, E., Portaels, F., Rigouts, L., Michel, A., Müller, A., Källenius, G., Van Helden, P.D., Hewinson, R.G., Zinsstag, J., Gordon, S. V., Smith, N.H.,** 2009. African 1, an epidemiologically important clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. *J. Bacteriol.* 191, 1951–1960.
- Mura, M., Bull, T.,** 2006. Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 854–859.
- Murphy, D., Gormley, E., Costello, E., O’Meara, D., Corner, L.A.L.,** 2010. The prevalence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) as determined by enhanced post mortem examination and bacteriological culture. *Res. Vet. Sci.* 88, 1–5.
- Musser, J.M., Amin, A., Ramaswamy, S.,** 2000. Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: Evidence of limited selective pressure. *Genetics* 155, 7–16.
- Namouchi, A., Didelot, X., Schöck, U., Gicquel, B., Rocha, E.P.C.,** 2012. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome Res.* 22, 721–734.
- Narang, R., Narang, P., Mendiratta, D.K.,** 2009. Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from water and soil in central India. *Indian J. Med. Microbiol.* 27, 247–250.
- Naranjo, V., Gortázar, C., Vicente, J., de la Fuente, J.,** 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet. Microbiol.* 127, 1–9.
- Navarro, Y., Romero, B., Bouza, E., Domínguez, L., Juan, L. de, García-de-Viedma, D.,** 2015. Detailed chronological analysis of microevolution events in herds infected persistently by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 183, 97–102.
- Neill, S.D., Hanna, J., O’Brien, J., McCracken, R.,** 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340–343.
- Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J.,** 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40, 41–52.
- Niemann, S., Richter, E., Dalügge-Tamm, H., Schlesinger, H., Graupner, D., Königstein, B., Gurath, G., Greinert, U., Rüsç-Gerdes, S.,** 2000. Two cases of *Mycobacterium microti*-derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 539–542.
- Nishi, J.S., Shury, T., Elkin, B.T.,** 2006. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: Strategies for management and research. *Vet. Microbiol.* 112, 325–338.
- Norby, B., Fosgate, G.T., Manning, E.J.B., Collins, M.T., Roussel, A.J.,** 2007. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: Association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Vet. Microbiol.* 124, 153–159.
- Nugent, G.,** 2011. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: a New Zealand case study. *Vet. Microbiol.* 151, 34–42.

- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Hickling, G.J.**, 2006. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: the Michigan, USA, experience. *Vet. Microbiol.* 112, 313–323.
- O'Reilly, L.M., Daborn, C.J.**, 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber. Lung Dis.* 76 Suppl 1, 1–46.
- OIE**, 2009. Bovine Tuberculosis, Terrestrial Manual 2009. Chap. 2.4.7.
- Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., Hatfull, G.F.**, 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.* 69, 164–174.
- Oloya, J., Kazwala, R., Lund, A., Opuda-Asibo, J., Demelash, B., Skjerve, E., Johansen, T.B., Djønne, B.**, 2007. Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. *BMC Microbiol.* 7, 95.
- Otal, I., Isabel, O., Gomez, A.B., Kremer, K., de Haas, P., García, M.J., Martín, C., van Soolingen, D.**, 2008. Mapping of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium bovis* isolates in relation to adaptation from the animal to human host. *Vet. Microbiol.* 129, 333–341.
- Pagnier, I., Raoult, D., La Scola, B.**, 2008. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ. Microbiol.* 10, 1135–1144.
- Palgrave, C.J., Benato, L., Eatwell, K., Laurenson, I.F., Smith, N.H.**, 2012. *Mycobacterium microti* infection in two meerkats (*Suricata suricatta*). *J. Comp. Pathol.* 146, 278–282.
- Palmer, M. V.**, 2013. *Mycobacterium bovis*: Characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 1–13.
- Palmer, M. V., C. Thacker, T., Waters, W.R., Robbe-Austerman, S., Harris, B.N.**, 2010. Investigations on deer to deer and deer to cattle transmission of the vaccine *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). *J. Vaccines Vaccin.* 01, 1–5.
- Palmer, M. V., Waters, W.R., Whipple, D.L.**, 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1483–1489.
- Palmer, M. V., Waters, W.R., Whipple, D.L.**, 2002. Lesion development in white-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Pathol.* 39, 334–340.
- Palmer, M. V., Whipple, D.L.**, 2006. Survival of *Mycobacterium bovis* on feedstuffs commonly used as supplemental feed for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Wildl. Dis.* 42, 853–8.
- Palmer, M. V., Whipple, D.L., Rhyan, J.C., Bolin, C.A., Saari, D.A.**, 1999. Granuloma development in cattle after intratonsillar inoculation with *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 60, 310–315.
- Palmer, M. V., Whipple, D.L., Waters, W.R.**, 2001. Experimental deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 62, 692–696.
- Panteix, G., Gutierrez, M.C., Boschiroli, M.L., Rouviere, M., Plaidy, A., Pressac, D., Porcheret, H., Chyderiotis, G., Ponsada, M., Van Oortegem, K., Salloum, S., Cabuzel, S., Bañuls, A.L., Van de Perre, P., Godreuil, S.**, 2010. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *J. Med. Microbiol.* 59, 984–989.
- Parsons, S.D.C., Drewe, J.A., van Pittius, N.C.G., Warren, R.M., van Helden, P.D.**, 2013. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 2004–2007.

- Pavlik, I., Svastova, P., Bartl, J., Dvorska, L., Rychlik, I.,** 2000. Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 212–217.
- Pavlik, I., Trcka, I., Parmova, I., Svobodova, J., Melicharek, I., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Pate, M., Lipiec, M.,** 2005. Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six Central European countries during the years 2000 – 2004. Vet. Med.-Czech 2005, 291–299.
- Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M.E., Källenius, G.,** 2012. Tuberculosis and HIV co-infection. PLoS Pathog. 8(2), e1002464.
- Payne, A.,** 2014. Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de *Mycobacterium bovis* et risque de transmission entre faune sauvage et bovins. Etude expérimentale en Côte d’Or. Thèse Université Lyon.
- Payne, A., Boschioli, M.L., Gueneau, E., Moyen, J.L., Rambaud, T., Dufour, B., Gilot-Fromont, E., Hars, J.,** 2012. Bovine tuberculosis in “Eurasian” badgers (*Meles meles*) in France. Eur. J. Wildl. Res. 59, 331–339.
- Payne, A., Chappa, S., Hars, J., Dufour, B., Gilot-Fromont, E.,** 2015. Wildlife visits to farm facilities assessed by camera traps in a bovine tuberculosis-infected area in France. Eur. J. Wildl. Res. 62(1), 33–42.
- Pepperell, C.S., Casto, A.M., Kitchen, A., Granka, J.M., Cornejo, O.E., Holmes, E.C., Holmes, E.C., Birren, B., Galagan, J., Feldman, M.W.,** 2013. The role of selection in shaping diversity of natural *M. tuberculosis* populations. PLoS Pathog. 9, e1003543.
- Petroff, S.A.,** 1915. Some cultural studies on the tubercle bacillus. Bull. Johns Hopkins Hosp 26, 276–279.
- Pfyffer, G.E., Auckenthaler, R., Van Embden, J.D. a, Van Soolingen, D.,** 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg. Infect. Dis. 4, 631–634.
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R.,** 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res. Vet. Sci. 74, 1–15.
- Pickup, R.W., Rhodes, G., Bull, T.J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., Hermon-Taylor, J.,** 2006. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. Appl. Environ. Microbiol. 72, 4067–4077.
- Piersimoni, C., Olivieri, A., Benacchio, L., Scarparo, C.,** 2006. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. J. Clin. Microbiol. 44, 20–28.
- Pillai, S.D., Widmer, K.W., Ivey, L.J., Coker, K.C., Newman, E., Lingsweiler, S., Baca, D., Kelley, M., Davis, D.S., Silvy, N.J., Adams, L.G.,** 2000. Failure to identify non-bovine reservoirs of *Mycobacterium bovis* in a region with a history of infected dairy-cattle herds. Prev. Vet. Med. 43, 53–62.
- Pollock, J.M., Neill, S.D.,** 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet. J. 163, 115–127.
- Pontioli, A., Travis, E.R., Sweeney, F.P., Porter, D., Gaze, W.H., Mason, S., Hibberd, V., Holden, J., Courtenay, O., Wellington, E.M.H.,** 2011. Pathogen quantitation in complex matrices: a multi-operator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition. PLoS One 6, e17916.
- Prasad, H.K., Singhal, A., Mishra, A., Shah, N.P., Katoch, V.M., Thakral, S.S., Singh, D. V, Chumber, S., Bal, S., Aggarwal, S., Padma, M. V, Kumar, S., Singh, M.K., Acharya, S.K.,** 2005. Bovine tuberculosis in India: potential basis for zoonosis. Tuberculosis (Edinb). 85, 421–428.
- Primm, T.P., Lucero, C.A., Falkinham, J.O.,** 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 17, 98–106.

- Pritchard, D.G.**, 1988. A Century of Bovine Tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *J. Comp. Pathol.* 99, 357–399.
- Prodinger, W.M., Brandsta, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschioli, M.L., Aranaz, A., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Skrypnyk, A., Erler, W., Niemann, S., Pavlik, I., Moser, I.**, 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4984–4992.
- Prodinger, W.M., Eigentler, A., Allerberger, F., Schonbauer, M., Glawischnig, W.**, 2002. Infection of Red Deer, Cattle, and Humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in Western Austria. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2270–2272.
- Prodinger, W.M., Indra, A., Koksalan, O.K., Kilicaslan, Z., Richter, E.**, 2014. *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12(12), 1501-1513.
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., Cole, S.T.**, 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* 46, 709–717.
- Radomski, N., Betelli, L., Moilleron, R., Haenn, S., Moulin, L., Cambau, E., Rocher, V., Gonçalves, A., Lucas, F.S.**, 2011. *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and *Enterococci*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5380–5386.
- Radomski, N., Roguet, A., Lucas, F.S., Veyrier, F.J., Cambau, E., Accrombessi, H., Moilleron, R., Behr, M., Moulin, L.**, 2013. atpE gene as a new useful specific molecular target to quantify *Mycobacterium* in environmental samples. *BMC Microbiol.* 13, 277.
- Radomski, N., Thibault, V.C., Karoui, C., de Cruz, K., Cochard, T., Gutierrez, C., Supply, P., Biet, F., Boschioli, M.L.**, 2010. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat and IS1311 Restriction Fragment Length Polymorphism typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1026–1034.
- Rahim, Z., Möllers, M., Te Koppele-Vije, A., De Beer, J., Zaman, K., Matin, M.A., Kamal, M., Raquib, R., Van Soelingen, D., Baqi, M. a., Heilmann, F.G.C., Van Der Zanden, A.G.M.**, 2007. Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype i among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38, 706–713.
- Rauzier, J., Moniz-Pereira, J., Gicquel-Sanzey, B.**, 1988. Complete nucleotide sequence of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene* 71, 315–321.
- Renwick, A.R., White, P.C.L., Bengis, R.G.**, 2007. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiol. Infect.* 135, 529–540.
- Reviriego-Gordejo, F.J., Vermeersch, J.P.**, 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet. Microbiol.* 112, 101–109.
- Richomme, C., Boschioli, M.L., Hars, J., Casabianca, F., Ducrot, C.**, 2010. Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean island, Corsica. *J. Wildl. Dis.* 46, 627–631.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J.L., Pierre-Audigier, C.**, 1999. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37, 852–857.
- Ritacco, V., López, B., De Kantor, I.N., Barrera, L., Errico, F., Nader, A.**, 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50, 365–367.
- Rivero, A., Márquez, M., Santos, J., Pinedo, A., Sánchez, M.A., Esteve, A., Samper, S., Martín, C.**, 2001. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by

- Mycobacterium bovis* strain B. Clin. Infect. Dis. 32, 159–161.
- Rivière, J., Fediaevsky, A., Hars, J., Richomme, C., Calavas, D., Hendrikx, P., 2011. SYLVATUB : Dispositif national de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage Organisation institutionnelle et réseau d'acteurs 2011–2012.
- Rodriguez, J.G., Burbano, C.S., Nuñez, C., González, C.E., Zambrano, M.M., García, M.J., Del Portillo, P., 2008. Rv3134c/devR/devS operon of *Mycobacterium bovis* BCG is differentially transcribed under “in vitro” stress conditions. Tuberculosis 88, 273–282.
- Rodríguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Javed, M.T., Sáez-Llorente, J.L., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. Emerg. Infect. Dis. 17, 532–535.
- Rodriguez-Campos, S., Schürch, A.C., Dale, J., Lohan, A.J., Cunha, M. V., Botelho, A., Cruz, K., Boschioli, M.L., Boniotti, M.B., Pacciarini, M., Garcia-Pelayo, M.C., Romero, B., de Juan, L., Domínguez, L., Gordon, S. V., van Soolingen, D., Loftus, B., Berg, S., Hewinson, R.G., Aranaz, A., Smith, N.H., 2012. European 2 - A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. Infect. Genet. Evol. 12, 866–872.
- Rodriguez-Campos, S., Smith, N.H., Boniotti, M.B., 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-Nuñez, J., Avelar, F.J., Marquez, F., Rivas-Santiago, B., Quiñones, C., Guerrero-Barrera, A.L., 2012. *Mycobacterium tuberculosis* complex detected by modified fluorescent in situ hybridization in lymph nodes of clinical samples. J. Infect Dev Ctries 6(1), 58–66.
- Rodríguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of free-living Amoebae. Crit. Rev. Microbiol. 20(3), 225–241.
- Rogers, L.M., Forrester, G.J., Wilson, G.J., Yarnell, R.W., Cheeseman, C.L., 2003. The role of setts in badger (*Meles meles*) group size, breeding success and status of TB (*Mycobacterium bovis*). J. Zool. 260, 209–215.
- Romero, B., Rodríguez, S., Bezos, J., Diaz, R., Francisca Copano, M., Merediz, I., Minguez, O., Marques, S., Palacios, J.J., De Viedma, D.G., Saez, J.L., Mateos, A., Aranaz, A., Dominguez, L., De Juan, L., 2011. Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. Emerg. Infect. Dis. 17, 2393–2395.
- Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S.D., Skuce, R., 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 40, 2126–2133.
- Roth, A., Fischer, M., Hamid, M.E., Michalke, S., Ludwig, W., Mauch, H., 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J. Clin. Microbiol. 36, 139–147.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G.K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M., Brittain, D., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. Clin. Infect. Dis. 33, 305–311.
- Roug, A., Geoghegan, C., Wellington, E., Miller, W. A., Travis, E., Porter, D., Cooper, D., Clifford, D.L., Mazet, J. A.K., Parsons, S., 2014. Utility of a fecal real-time PCR protocol for detection of *Mycobacterium bovis* infection in African buffalo (*Syncerus caffer*). J. Wildl. Dis. 50, 140–142.
- Rowe, M.T., Grant, I.R., 2006. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. Lett. Appl. Microbiol. 42, 305–11.
- Safi, H., Barnes, P.F., Lakey, D.L., Shams, H., Samten, B., Vankayalapati, R., Howard, S.T., 2004. IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol. 52, 999–1012.

- Saleeb, P.G., Drake, S.K., Murray, P.R., Zelazny, A.M.,** 2011. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1790–1794.
- Santos, N., Almeida, V., Gortázar, C., Correia-Neves, M.,** 2015a. Patterns of *Mycobacterium tuberculosis*-complex excretion and characterization of super-shedders in naturally-infected wild boar and red deer. *Vet. Res.* 46, 129.
- Santos, N., Santos, C., Valente, T., Gortázar, C., Almeida, V., Correia-Neves, M.,** 2015b. Widespread environmental contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex revealed by a molecular detection protocol. *PLoS One* 10, e0142079.
- Savelkoul, P.H.M., Catsburg, A., Mulder, S., Oostendorp, L., Schirm, J., Wilke, H., van der Zanden, A.G.M., Noordhoek, G.T.,** 2006. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: Comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *J. Microbiol. Methods* 66, 177–180.
- Scanlon, M.P., Quinn, P.J.,** 2000a. The survival of *Mycobacterium bovis* in sterilized cattle slurry and its relevance to the persistence of this pathogen in the environment. *Ir. Vet. J.* 53, 412–415.
- Scanlon, M.P., Quinn, P.J.,** 2000b. Inactivation of *Mycobacterium bovis* in cattle slurry by five volatile chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 89, 854–861.
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P.D., Nathan, C., Schoolnik, G.K.,** 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J. Exp. Med.* 198, 693–704.
- Schoepf, K., Prodingler, W.M., Glawischnig, W., Hofer, E., Revilla-Fernandez, S., Hofrichter, J., Fritz, J., Köfer, J., Schmoll, F.,** 2012. A two-years' survey on the prevalence of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in red deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet. Sci.* 2012, 245138.
- Schröder, K.H.,** 1982. Isolation of *M. africanum* from German patients. *Bull. Int. Union Tuberc.* 57, 249–53.
- Schürch, A.C., van Soolingen, D.,** 2012. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. *Infection, Genetics and Evolution.* 12, 602–609.
- Shepard, C.C.,** 1960. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J. Exp. Med.* 112, 445–454.
- Shiloh, M.U., Manzanillo, P., Cox, J.S.,** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* Senses Host-Derived Carbon Monoxide during Macrophage Infection. *Cell Host Microbe* 3, 323–330.
- Shinnick, T.M., Good, R.C.,** 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 884–901.
- Shitikov, E., Ilina, E., Chernousova, L., Borovskaya, A., Rukin, I., Afanas'ev, M., Smirnova, T., Vorobyeva, A., Larionova, E., Andreevskaya, S., Kostrzewa, M., Govorun, V.,** 2012. Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria. *Infect. Genet. Evol.* 12, 838–845.
- Shrikrishna, D., de la Rua-Domenech, R., Smith, N.H., 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.
- Shuralev, E., Quinn, P., Doyle, M., Duignan, A., Kwok, H.F., Bezos, J., Olwill, S.A., Gormley, E., Aranaz, A., Good, M., Davis, W.C., Clarke, J., Whelan, C.,** 2012. Application of the Enfer chemiluminescent multiplex ELISA system for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in goats. *Vet. Microbiol.* 154, 292–297.
- Skuce, R.A., McCorry, T.P., McCarroll, J.F., Roring, S.M.M., Scott, A.N., Brittain, D., Hughes, S.L., Hewinson, R.G., Neill, S.D.,** 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR

- targets. *Microbiology* 148, 519–528.
- Skuce, R.A., Brittain, D., Hughes, M.S., Beck, L.A., Neill, S.D.**, 1994. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 32, 2387–2392.
- Slana, I., Kaevska, M., Kralik, P., Horvathova, A., Pavlik, I.**, 2010. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Vet. Microbiol.* 144, 437–443.
- Smith, N.H.**, 2012. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect. Genet. Evol.* 12, 857–865.
- Smith, N.H., Berg, S., Dale, J., Allen, A.R., Rodriguez, S., Romero, B., Matos, F., Ghebremichael, S., Karoui, C., Donati, C., Machado, A. da C., Mucavele, C., Kazwala, R.R., Hilty, M., Cadmus, S.I., Ngandolo, B.N.R., Habtamu, M., Oloya, J., Muller, A., Milian-Suazo, F., Andrievskaia, O., Projahn, M., Barandiarán, S., Macías, A., Müller, B., Zanini, M.S., Ikuta, C.Y., Rodriguez, C.A.R., Pinheiro, S.R., Figueroa, A., Cho, S.-N., Mosavari, N., Chuang, P.-C., Jou, R., Zinsstag, J., van Soolingen, D., Costello, E., Aseffa, A., Proaño-Perez, F., Portaels, F., Rigouts, L., Cataldi, A.A., Collins, D.M., Boschioli, M.L., Hewinson, R.G., Ferreira Neto, J.S., Surujballi, O., Tadyon, K., Botelho, A., Zárraga, A.M., Buller, N., Skuce, R., Michel, A., Aranaz, A., Gordon, S. V., Jeon, B.-Y., Källenius, G., Niemann, S., Boniotti, M.B., van Helden, P.D., Harris, B., Zumárraga, M.J., Kremer, K.**, 2011. European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1340–1351.
- Smith, N.H., Crawshaw, T., Parry, J., Birtles, R.J.**, 2009. *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2551–2559.
- Smith, N.H., Kremer, K., Inwald, J., Dale, J., Driscoll, J.R., Gordon, S. V., Van Soolingen, D., Glyn Hewinson, R., Maynard Smith, J.**, 2006. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Theor. Biol.* 239, 220–225.
- Smith, N.H., Upton, P.**, 2012. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org. *Infect. Genet. Evol.* 12, 873–876.
- Smith, R.M.M., Drobniewski, F., Gibson, A., Montague, J.D.E., Logan, M.N., Hunt, D., Hewinson, G., Salmon, R.L., O’Neill, B.**, 2004. *Mycobacterium bovis* infection, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 539–541.
- Smithwick, R.W., Stratigos, C.B., David, H.L.**, 1975. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1, 411–413.
- Soini, H., Musser, J.M.**, 2001. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin. Chem.* 47, 809–814.
- Sola, C., Filliol, I., Gutierrez, M.C., Mokrousov, I., Vincent, V., Rastogi, N.**, 2001. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 390–396.
- Soo, P.-C., Horng, Y.-T., Hsueh, P.-R., Shen, B.-J., Wang, J.-Y., Tu, H.-H., Wei, J.-R., Hsieh, S.-C., Huang, C.-C., Lai, H.-C.**, 2006. Direct and simultaneous identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) by rapid multiplex nested PCR-ICT assay. *J. Microbiol. Methods* 66, 440–448.
- Sreevatsan, S., Pan, X.**, 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 9869–9874.
- Stahl, D.A., Urbance, J.W.**, 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172, 116–124.

- Steingart, K.R., Ng, V., Henry, M., Hopewell, P.C., Ramsay, A., Cunningham, J., Urbanczik, R., Perkins, M.D., Aziz, M.A., Pai, M.,** 2006. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 6, 664–674.
- Stender, H., Lund, K., Petersen, K.H., Rasmussen, O.F., Hongmanee, P., Miorner, H., Godtfredsen, S.E.,** 1999a. Fluorescence In Situ Hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of *Mycobacterium* cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2760–2765.
- Stender, H., Mollerup, T.A., Lund, K., Petersen, K.H., Hongmanee, P., Godtfredsen, S.E.,** 1999b. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *Int. J. Tuberc. lung Dis.* 3, 830–837.
- Stewart, L.D., McNair, J., McCallan, L., Gordon, A., Grant, I.R.,** 2013. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. *PLoS One* 8, e58374.
- Stewart, L.D., McNair, J., McCallan, L., Thompson, S., Kulakov, L.A., Grant, I.R.,** 2012. Production and evaluation of antibodies and phage display-derived peptide ligands for immunomagnetic separation of *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1598–1605.
- Stinear, T.P., Mve-Obiang, A., Small, P.L.C., Frigui, W., Pryor, M.J., Brosch, R., Jenkin, G.A., Johnson, P.D.R., Davies, J.K., Lee, R.E., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S.F., Leadlay, P.F., Cole, S.T.,** 2004. Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1345–1349.
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirolu, M.L., Besnier, J.M.,** 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1249–1251.
- 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, M.C., 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, 4498–4510.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Locht, C.,** 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J. Clin.* 39, 3563–3571.
- Supply, P., Marceau, M., Mangenot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., Majlessi, L., Criscuolo, A., Tap, J., Pawlik, A., Fiette, L., Orgeur, M., Fabre, M., Parmentier, C., Frigui, W., Simeone, R., Boritsch, E.C., Debie, A.-S., Willery, E., Walker, D., Quail, M. a, Ma, L., Bouchier, C., Salvignol, G., Sayes, F., Cascioferro, A., Seemann, T., Barbe, V., Locht, C., Gutierrez, M.-C., Leclerc, C., Bentley, S.D., Stinear, T.P., Brisse, S., Médigue, C., Parkhill, J., Cruveiller, S., Brosch, R.,** 2013. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Genet.* 45, 172–179.
- Sweeney, F.P., Courtenay, O., Hibberd, V., Hewinson, R.G., Reilly, L.A., Gaze, W.H., Wellington, E.M.H.,** 2007. Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by real-time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7471–7473.
- Sweeney, F.P., Courtenay, O., Ul-Hassan, A., Hibberd, V., Reilly, L.A., Wellington, E.M.H.,** 2006. Immunomagnetic recovery of *Mycobacterium bovis* from naturally infected environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 364–369.

- Tanner, M., Michel, A.L.**, 1999. Investigation of the viability of *M. bovis* under different environmental conditions in the Kruger National Park. *J. Vet. Res.* 185–190.
- Taquet, A., Tison, F.**, 1961. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium. *Ann. Inst. Pasteur* 100, 676–680.
- Taylor, C., Jahans, K., Palmer, S., Okker, M., Brown, J., Steer, K.**, 2006. *Mycobacterium microti* isolated from two pigs. *Vet. Rec.* 159, 59–60.
- Taylor, S.J., Ahonen, L.J., de Leij, F.A.A.M., Dale, J.W.**, 2003. Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoeba. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4316–4319.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Botrger, E.C., Bodmer, T.**, 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 175–178.
- Thacker, T.C., Palmer, M. V, Robbe-Austerman, S., Stuber, T.P., Waters, W.R.**, 2015. Anatomical distribution of *Mycobacterium bovis* genotypes in experimentally infected white-tailed deer. *Vet. Microbiol.* 180(1-2), 75–81.
- Thierry, D., Brisson-Noël, A., Vincent-Lévy-Frébault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., Gicquel, B.**, 1990a. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2668–2673.
- Thierry, D., Cave, M.D., Eisenach, K.D., Crawford, J.T., Bates, J.H., Gicquel, B., Guesdon, J.L.**, 1990b. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 18, 188.
- Thoen, C., LoBue, P., De Kantor, I.**, 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.* 112, 339–345.
- Thomas, V., Blanc, D., Bille, J., Greub, G.**, 2006. Biodiversity of amoebae resistant micro-organisms in an hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2428–2438.
- Thomas, V., Loret, J.-F., Jousset, M., Greub, G.**, 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol.* 10, 2728–2745.
- Thomas, V., McDonnell, G.**, 2007. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 349–357.
- Thorel, M.F.**, 1980. Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. *Tubercle* 61, 101–104.
- Tolhurst, B.A., Delahay, R.J., Walker, N.J., Ward, A.I., Roper, T.J.**, 2009. Behaviour of badgers (*Meles meles*) in farm buildings: Opportunities for the transmission of *Mycobacterium bovis* to cattle? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 117, 103–113.
- Torgerson, P.R., Torgerson, D.J.**, 2010. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends Microbiol.* 18, 67–72.
- Tortoli, E.**, 2014. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 727–752.
- Tortoli, E.**, 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 906–910.
- Tortoli, E.**, 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy : the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 319–354.

- Torvinen, E., Lehtola, M.J., Martikainen, P.J., Miettinen, I.T.**, 2007. Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6201–6207.
- Traag, B.A., Driks, A., Stragier, P., Bitter, W., Broussard, G., Hatfull, G., Chu, F., Adams, K.N., Ramakrishnan, L., Losick, R.**, 2010. Do mycobacteria produce endospores? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 878–881.
- Travis, E.R., Gaze, W.H., Pontiroli, A., Sweeney, F.P., Porter, D., Mason, S., Keeling, M.J.C., Jones, R.M., Sawyer, J., Aranaz, A., Rizaldos, E.C., Cork, J., Delahay, R.J., Wilson, G.J., Hewinson, R.G., Courtenay, O., Wellington, E.M.H.**, 2011. An inter-laboratory validation of a real time PCR assay to measure host excretion of bacterial pathogens, particularly of *Mycobacterium bovis*. *PLoS One* 6, e27369.
- Trujillo, M.E., Velázquez, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E.**, 2004. *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1459–1463.
- Truman, R.**, 2005. Leprosy in wild armadillos. *Lepr. Rev.* 76, 198–208.
- Tsairidou, S., Woolliams, J.A., Allen, A.R., Skuce, R.A., McBride, S.H., Wright, D.M., Bermingham, M.L., Pong-Wong, R., Matika, O., McDowell, S.W.J., Glass, E.J., Bishop, S.C.**, 2014. Genomic prediction for tuberculosis resistance in dairy cattle. *PLoS One* 9(5), e96728.
- Turenne, C.Y.**, 2004. *Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobe-positive for *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 659–667.
- Van Donsel, D.J., Larkin, E.P.**, 1977. Persistence of *Mycobacterium bovis* BCG in soil and on vegetables spray irrigated with sewage effluent and sludge. *J. Food Prot.* 40, 160–163.
- Van Ingen, J., Bendien, S.A., de Lange, W.C.M., Hoefsloot, W., Dekhuijzen, P.N.R., Boeree, M.J., van Soolingen, D.**, 2009. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax* 64, 502–506.
- Van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M.J., Simeone, R., Brosch, R., van Soolingen, D.**, 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 653–655.
- Van Ingen, J. Van**, 2013. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 34, 103–109.
- Van Pittius, N.C.G., Perrett, K.D., Michel, A.L., Keet, D.F., Hlokwé, T., Streicher, E.M., Warren, R.M., van Helden, P.D.**, 2012. Infection of African Buffalo (*Syncerus Caffer*) by *Oryx* Bacillus, A rare member of the antelope clade of the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex. *J. Wildl. Dis.* 48, 849–857.
- Van Soolingen, D., De Haas, P.E.W., Haagsma, J., Eger, T., Hermans, P.W.M., Ritacco, V., Alito, A., Van Embden, J.D.A.**, 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2425–2433.
- Van Soolingen, D., Hermans, P.W.M., De Haas, P.E.W., Soll, D.R., Van Embden, J.D.A.**, 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2578–2586.
- Vandal, O.H., Pierini, L.M., Schnappinger, D., Nathan, C.F., Ehrhart, S.**, 2008. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 14, 849–854.
- Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M., Bozzetta, E.**, 2008. Comparison of

- histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 20, 164–169.
- Velayati, A.A., Farnia, P., Mozafari, M., Malekshahian, D., Farahbod, A.M., Seif, S., Rahideh, S., Mirsaedi, M.,** 2015. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from water and soil samples of a metropolitan city. *CHEST J.* 147, 1094.
- Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J.M., Fernández-De-Mera, I.G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortázar, C.,** 2007. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet. Res.* 38, 451–464.
- Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Rutherford, R., Liu, Y., Schoolnik, G.K.,** 2004. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes. *Tuberculosis (Edinb).* 84, 256–262.
- Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K.,** 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* 198, 705–713.
- Wagner, J.C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., Levisseur, S.,** 1958. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape Hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 181, 284–285.
- Walter, W.D., Smith, R., Vanderklok, M., VerCauteren, K.C.,** 2014. Linking bovine tuberculosis on cattle farms to white-tailed deer and environmental variables using Bayesian hierarchical analysis. *PLoS One* 9, e90925.
- Wang, Y., Ogawa, M., Fukuda, K., Miyamoto, H., Taniguchi, H.,** 2006. Isolation and identification of mycobacteria from soils at an illegal dumping site and landfills in Japan. *Microbiol. Immunol.* 50, 513–524.
- Ward, A.I., Judge, J., Delahay, R.J.,** 2010. Farm husbandry and badger behaviour: Opportunities to manage badger to cattle transmission of *Mycobacterium bovis*? *Prev. Vet. Med.* 93, 2–10.
- Warren, R.M., Gey Van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., De Kock, M., Gutierrez, M.C., Chege, G.K., Victor, T.C., Hoal, E.G., Van Helden, P.D.,** 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10, 818–822.
- Waters, W.R., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., Gormley, E., Palmer, M. V, Thacker, T.C., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Linscott, R., Martel, E., Milian, F., Foshaug, W., Lawrence, J.C.,** 2011. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1882–1888.
- Wayne, L.G., Hayes, L.G.,** 1996. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* 64, 2062–2069.
- Wells, A.Q.,** 1937. Tuberculosis in wild voles. *Lancet* 229, 1221.
- Wells, A.Q., Robb-Smith, A.H.T.,** 1946. Murine type of tubercle bacillus (the vole acid-fast bacillus). *Spec. Rep. Ser. Med. Res. Cou., London* 259.
- Whan, L., Grant, I.R., Rowe, M.T.,** 2006. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol.* 6, 63.
- Whiley, H., Keegan, A., Giglio, S., Bentham, R.,** 2012. *Mycobacterium avium* complex - the role of potable water in disease transmission. *J. Appl. Microbiol.* 113, 223–32.
- White, P.C.L., Brown, J.A., Harris, S.,** 1993. Badgers (*Meles meles*), cattle and bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): a hypothesis to explain the influence of habitat on the risk of disease transmission in southwest England. *Proc. R. Soc. London B* 253, 277–284.

- Whittington, R., Marshall, D., Nicholls, P.J., Marsh, I.B., Reddacliff, L.A.**, 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2989–3004.
- WHO**, 2014. Global leprosy update 2013. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 89, 389–400.
- WHO**, 2014. Global Tuberculosis Report 2014.
- Williams, R.S., Hoy, W.A.**, 1930. The viability of *B. tuberculosis (bovinus)* on pasture land, in stored faeces and in liquid manure. *J. Hyg. (Lond.)* 30, 413–419.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguet, C., Wöbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., Van Soolingen, D., Rüsche-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., Meyer, A., Supply, P., Niemann, S.**, 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog.* 4(9), e1000160.
- Witmer, G., Fine, A.E., Gionfriddo, J., Pipas, M., Shively, K., Piccolo, K., Burke, P.**, 2010. Epizootiologic survey of *Mycobacterium bovis* in wildlife and farm environments in northern Michigan. *J. Wildl. Dis.* 46, 368–378.
- Wobeser, G.**, 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. *Can. Vet. J.* 50, 1169–1176.
- Wright, D.M., Allen, A.R., Mallon, T.R., McDowell, S.W.J., Bishop, S.C., Glass, E.J., Bermingham, M.L., Woolliams, J.A., Skuce, R.A.**, 2013. Field-isolated genotypes of *Mycobacterium bovis* vary in virulence and influence case pathology but do not affect outbreak size. *PLoS One* 8(9), e74503.
- Young, J.S., Gormley, E., Wellington, E.M.H.**, 2005. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1946–1952.
- Zanella, G., Durand, B., Hars, J., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., Duvauchelle, A., Fermé, M., Karoui, C., Boschioli, M.L.**, 2008. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *J. Wildl. Dis.* 44, 99–108.
- Zelazny, A.M., Calhoun, L.B., L., Shea, Y.R., Fischer, S.H.**, 2005. Identification of *Mycobacterium* species by *secA1* sequences. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1051–1058.
- Zeng, W., Zhang, Y., Zhao, X., Huang, G., Jiang, Y., Dong, H., Li, X., Wan, K., He, C.**, 2013. Occurrence of non-tuberculous mycobacteria species in livestock from northern China and first isolation of *Mycobacterium caprae*. *Epidemiol. Infect.* 141, 1545–1551.
- Zhang, J., Abadia, E., Refregier, G., Tafaj, S., Boschioli, M.L., Guillard, B., Andremont, A., Ruimy, R., Sola, C.**, 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: Improving efficiency, throughput and discriminative power of “spoligotyping” with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J. Med. Microbiol.* 59, 285–294.
- Zhang, Y., Yew, W.**, 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 13, 1320–1330.
- Zolg, J.W., Philippi-Schulz, S.**, 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J Clin Microbiol* 32, 2801–2812.
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., Daffé, M.**, 2008. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* 190, 5672–5680.

Annexes

Annexe 1 : Détection de *Mycobacterium bovis* dans l'environnement : Premiers résultats des recherches menées en Côte-d'Or *

Détection de *Mycobacterium bovis* dans l'environnement : Premiers résultats des recherches menées en Côte-d'Or *

Elodie Barbier¹ et Alain Hartmann¹

RESUME

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

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

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

SUMMARY

Since 2000, an increasing number of cases of bovine tuberculosis were found in cattle in Côte-d'Or and in wild animals infected by *Mycobacterium bovis* in the vicinity of contaminated farms. In some areas, wildlife could be considered as the likely source of cattle contamination. We assume that contamination between wild and domestic animals may occur indirectly by environmental factors (soil, water, feces).

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

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

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

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

I - Introduction

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

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

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

L'hypothèse d'un cycle épidémiologique de transmission de la maladie entre bovins et faune sauvage est maintenant reconnue [Richomme *et al.*, 2010], même si celui-ci est encore mal connu. En France, les exemples de la forêt de Brotonne [Zanella *et al.*, 2008], de la Côte-d'Or, de la Dordogne [Payne *et al.*, 2012], de la Corse [Richomme *et al.*, 2010], et ceux de l'Espagne [Aranaz *et al.*, 2004], ont montré que les spoligotypes et les profils VNTR (Variable Number Tandem Repeat) des souches isolées chez les animaux sauvages tués ou piégés à

proximité des cheptels bovins infectés sont exactement les mêmes que ceux des souches bovines. Cette identité des souches résulterait d'une transmission directe ou indirecte entre faune domestique et sauvage et vice et versa. Bien que quelques contacts directs soient possibles entre faune sauvage et bovins [Böhm *et al.*, 2009], il semble probable que la transmission indirecte de *M. bovis* soit la voie de transmission prépondérante entre bovin et faune sauvage et inversement. Il semble établi que la transmission indirecte de *M. bovis* soit la principale voie de transmission entre bovins et faune sauvage et inversement. La transmission indirecte ferait intervenir une excrétion de *M. bovis* par les animaux infectés au niveau respiratoire, salivaire, urinaire et/ou fécal : les animaux excréteurs déposeraient donc le bacille dans l'environnement par le biais de leurs excréments ; l'environnement deviendrait alors un réservoir potentiel pour le bacille. La contamination d'animaux sains pourrait se produire par ingestion ou inhalation d'aérosols produits à partir des matrices environnementales souillées. Par exemple, la formation de bioaérosols contaminés par des souches bactériennes d'actinomycètes thermotolérants est maintenant bien documentée à partir de matrices solides ou liquides [Betteli *et al.*, 2013]. Dans l'environnement des bovins, ces bioaérosols pourraient être formés à partir d'eau ou de mélanges eau-sédiments dans les zones d'abreuvement ou à partir de particules fines de sol (argiles).

L'excrétion respiratoire, salivaire, urinaire et fécale de *M. bovis* par des blaireaux tuberculeux a été documentée en Angleterre [Gallagher *et al.*, 1998 ; Gavier-Widen *et al.*, 2001 ; Corner *et al.*, 2011]. De plus, *Mycobacterium bovis* a la capacité de survivre en dehors de ses hôtes pendant des durées

assez longues. Cette durée varie en fonction de la nature du support contaminé (eau, sol, foin, maïs, etc.), de la température, de l'humidité et de l'exposition aux UV [Courtenay *et al.*, 2006 ; Fine *et al.*, 2011 ; Ghodbane *et al.*, 2014]. La survie de *M. bovis* dans des microcosmes de sols contaminés soumis aux facteurs climatiques a même été démontrée aux Etats-Unis pour des durées allant jusqu'à environ 88 jours [Fine *et al.*, 2011].

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

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique indépendante de la croissance de la bactérie. Quelques études ont permis la détection par PCR du bacille dans des sols et des latrines de blaireaux au Royaume-Uni et en Irlande à proximité de cheptels bovins infectés [Young *et al.*, 2005 ; Courtenay *et al.*, 2006 ; Sweeney *et al.*, 2006 et 2007]. Les objectifs de ce travail visaient, en premier lieu, à mettre au point un système de détection moléculaire à la fois spécifique du bacille et assez sensible pour détecter de faibles concentrations dans les différentes matrices environnementales suspectées pour leur rôle de réservoir potentiel. Ces nouveaux outils moléculaires nous ont permis d'analyser les

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

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

II - Matériel et méthodes

Souches bactériennes utilisées

La souche vaccinale *Mycobacterium bovis* BCG strain 1331 (SSI, Copenhague, Danemark) a été utilisée pour l'évaluation de la sensibilité de la PCR en temps réel (qPCR) sur souche pure et sur microcosmes de sol inoculé ainsi que pour la réalisation des gammes étalon de qPCR (PCR

quantitative). Cette souche a été cultivée sur gélose Coletsos pendant 30 jours, puis remise en suspension dans du milieu Middlebrook 7H9 enrichi en ADC (Sigma Aldrich). Après mesure de la densité optique à 600nm, la suspension a été diluée en cascade au 1/10 pour inoculer les microcosmes de sol et d'eau. Un

dénombrement des dilutions est ensuite réalisé sur milieu Middlebrook 7H11 enrichi en OADC (Sigma Aldrich).

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

Extraction de l'ADN et purification

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

Les échantillons d'eau ont été filtrés sur des membranes d'ester de cellulose de 0,45 µm de porosité. Les filtres ont été broyés avec de l'azote liquide, puis l'ADN extrait selon la méthode précédemment citée, à l'exception de la purification sur colonnes PVPP (polyvinylpyrrolidone insoluble).

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

Développement de trois systèmes de détection moléculaire

La bibliographie nous a permis de sélectionner trois cibles génétiques situées sur des locus différents très spécifiques de *M. bovis* [Huard *et al.*, 2002 ; Brodin *et al.*, 2002]. Les génomes entièrement séquencés des mycobactéries du MTBC (complexe *M. tuberculosis* comprenant *M. bovis*) et des MNT (mycobactéries non tuberculeuses) sur le site NCBI nous ont permis d'aligner les séquences de ces trois gènes à la recherche de zones très conservées dans le MTBC. Chaque système de détection moléculaire en PCR temps réel créé comprend une amorce Forward, une amorce Reverse et une sonde oligonucléotidique marquée par

deux fluorochromes (sonde TaqMan), choisies à l'aide du logiciel Primer3 (Simgene.com). Pour chaque système, nous avons également conçu des amorces de PCR à l'extérieur des séquences précédentes de façon à réaliser des PCR nichées (utilisées uniquement en confirmation des PCR en temps réel positives).

Spécificité et sensibilité des systèmes de détection sur souches pures, sol et eau

La spécificité des trois systèmes de détection a été testée par PCR en temps réel sur l'ADN de 19 spoligotypes différents de *M. bovis*, quatre souches de mycobactéries appartenant au MTBC, deux au Complexe avium et 20 MNT (tableau 1). Nous avons également vérifié que la PCR en temps réel ne donnait pas de signal sur des ADN extraits de 22 sols provenant du Morbihan, des Yvelines, du Haut-Rhin et de Côte-d'Or, prélevés en dehors des zones où sévit la tuberculose bovine. Ces sols présentent des caractéristiques physico-chimiques variées. Pour déterminer la sensibilité de détection de la PCR en temps réel de chacun des systèmes, la quantification a été réalisée sur des dilutions du gène cible cloné dans un plasmide (gamme allant de 1 copie à 10⁶ copies du gène recherché dans 5 µl). La limite de détection de la PCR en temps réel dans le sol a été évaluée par l'inoculation de suspension bactérienne de *M. bovis* BCG dans un sol dont les caractéristiques physico-chimiques sont identiques aux sols incriminés en Côte-d'Or. Chaque microcosme de sol de 2 g a été inoculé avec des suspensions bactériennes pour obtenir une concentration finale en bactéries variant de 10 à 10⁵ CFU par g de sol. Des aliquotes de 100 ml d'eau non stérile issue d'un ruisseau hors zone de tuberculose ont été inoculés avec ces mêmes concentrations.

Tableau 1
Souches bactériennes et spoligotypes utilisés pour évaluer la spécificité des trois systèmes
de détection moléculaire

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

Choix des sites de prélèvements

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

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

à *M. bovis* chez des blaireaux piégés ou des sangliers tués à la chasse.

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

III - Résultats

Les systèmes de détection conçus sont spécifiques des espèces appartenant au MTBC *in silico*

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

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

Spécificité et sensibilité des systèmes de détection sur souches pures et microcosmes de sol inoculés

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

Dans le complexe MTBC, nous avons testé nos systèmes sur *M. microti*, *M. tuberculosis*, *M.*

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

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

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

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

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

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

cribler l'ensemble des échantillons environnementaux.

Premiers résultats sur les échantillons environnementaux

Sur les huit communes ciblées, 150 échantillons de sol, 18 échantillons de sédiments, cinq échantillons d'eau et huit échantillons de fèces de blaireaux ont été prélevés. Parmi les 150 sols prélevés, 28 l'ont été dans des terriers de blaireaux et de renards. Parmi les terriers de blaireaux prélevés, certains étaient potentiellement des terriers de blaireaux infectés par *M. bovis*, car des animaux piégés à proximité se sont révélés être porteurs de *M. bovis*. Cependant en 2013, nous n'avons pu obtenir aucune certitude sur les terriers réellement occupés par les blaireaux porteurs de *M. bovis* (piégeage des blaireaux en coulée et non pas en gueule de terrier).

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

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

IV - Discussion

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

sols de terriers et des latrines de blaireaux à proximité de cheptels bovins infectés [Courtenay *et al.*, 2006 ; Sweeney *et al.*, 2006 et 2007 ; Young *et al.*, 2005 ; Travis *et al.*, 2011]. Des études expérimentales ont montré que *M. bovis* pouvait survivre plusieurs mois dans le sol [Maddock, 1933 ; Young *et al.*, 2005 ; Fine *et al.*, 2011 ; Ghodbane *et al.*, 2014], tout en restant virulent [Maddock, 1933 ; Ghodbane *et al.*, 2014]. La détection du bacille dans l'environnement fréquenté par les animaux domestiques ou sauvages infectés n'a jamais été décrite en France. Dans certaines zones de Côte-d'Or, la transmission indirecte du bacille aux bovins par l'environnement est fortement suspectée.

Dans cette étude, nous avons développé trois systèmes de détection moléculaire afin d'optimiser la mise en évidence de *M. bovis*

dans des échantillons environnementaux complexes, afin de s'affranchir de la culture. En effet, l'isolement de *M. bovis* dans les matrices environnementales par la culture est long car, d'une part, un traitement préalable est nécessaire pour s'affranchir de la flore microbienne de contamination et, d'autre part, le bacille a une croissance très lente. Contrairement à la culture, la technique de PCR en temps réel permet une détection rapide du bacille, sous réserve que le ou les gènes ciblés soient très spécifiques, de façon à détecter et quantifier une espèce bactérienne particulière dans un mélange d'ADN complexe. Mais cette technique rencontre néanmoins quelques limites techniques :

Les échantillons environnementaux contiennent une flore microbienne et animale abondante et variée ; l'ADN extrait contient une grande diversité de séquences génétiques à l'origine de faux positifs. Ainsi, des espèces proches de *M. bovis*, notamment les mycobactéries environnementales, ainsi que des espèces encore inconnues, peuvent être présentes dans les échantillons. Il est donc nécessaire de s'assurer de la spécificité des systèmes de détection. La détection du bacille par la recherche associée de trois cibles génétiques avec le système TaqMan nous a permis de développer une méthode de détection moléculaire spécifique et sensible de *M. bovis* dans des matrices complexes ;

L'extraction d'ADN de matrices environnementales s'accompagne d'une co-extraction d'inhibiteurs potentiels de la PCR (acides humiques, polyphénols, polysaccharides et métaux). L'acide humique, par exemple, inhibe l'activité de la Taq polymérase [Kermekchiev *et al.*, 2009] et se lie sur des sites spécifiques de l'ADN empêchant son amplification [Opel *et al.*, 2010]. La dilution des échantillons d'ADN utilisés en PCR en temps réel permet la dilution des inhibiteurs et limite leur action. Toutefois, lorsque la cible recherchée est présente en

petit nombre de copies, la dilution de l'ADN rend la détection moins efficace. C'est pourquoi nous analysons l'ADN extrait pur et dilué au 1/5, au 1/10 et au 1/20 en PCR en temps réel, de façon à rechercher la quantité d'inhibiteurs minimale permettant d'amplifier la cible ;

Les limites de détection de la PCR se situent au mieux autour de 1000 copies de gènes par g de sol. Les seuils de détection des trois systèmes que nous avons créés se situent au-dessus de 1000 copies du gène par g de sol ce qui correspond à des valeurs en adéquation avec d'autres résultats obtenus sur la détection de bactéries dans les sols [Ibekwe et Grieve, 2003].

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

L'excrétion de la bactérie par la voie respiratoire, les urines, les matières fécales ou les plaies de morsure n'est pas systématique chez les blaireaux infectés. Le niveau d'excrétion dépend de la localisation et de l'intensité des lésions. Il semble que l'excrétion la plus importante soit trouvée chez des animaux à un stade avancé de la maladie [Gallagher *et al.*, 1998 ; Corner *et al.*, 2012]. En

Côte-d'Or, une étude menée entre 2009 et 2011 a montré que seuls 1,7 % des blaireaux piégés et analysés (19 sur 1 146) présentaient des lésions visibles, alors que la bactérie était retrouvée sur 5,6 % des blaireaux (49 sur 878) dans la zone de tuberculose bovine [Payne *et al.*, 2012]. L'absence de lésion visible sur la majorité des blaireaux analysés pourrait expliquer une absence d'excrétion ou une faible excrétion de *M. bovis* dans l'environnement.

Une autre difficulté réside dans la réalisation spatiale et temporelle de l'échantillonnage. Les

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

V - Conclusion et perspectives

Nous avons développé des outils de PCR en temps réel à la fois spécifiques et sensibles pour la détection de *M. bovis* dans les matrices environnementales. Malgré le nombre important d'échantillons analysés, seuls deux échantillons peu chargés en *M. bovis* ont pu être mis en évidence. Ces outils de PCR en temps réel vont encore être optimisés en 2014 et permettre l'analyse des nombreux prélèvements prévus dans des zones plus ciblées de Côte-d'Or dans lesquelles bovins et faune sauvage infectés ont été retrouvés. Plusieurs méthodes de culture sont en cours d'essai et seront utilisées sur les échantillons prélevés afin de montrer la viabilité des bactéries dans l'environnement.

Bibliographie

- Aranaz A., De Juan L., Montero N., Sánchez C., Galka M., Delso C., Alvarez J., Romero B., Bezos J., Vela A. I., Briones V., Mateos A., Domínguez L. - Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 2004, **42**, 2602-2608.
- Betelli L., Duquenne P., Grenouillet F., Simon X., Scherer E., Géhin E., Hartmann A. - Development and evaluation of a method for the quantification of airborne *Thermoactinomyces vulgaris* by real-time PCR. *Journal of microbiological methods*, 2013, **92**, 25-32.
- Böhm M., Hutchings M.R., White P.C.L. - Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. *PLoS One*, 2009, **4**(4), e5016.
- Brodin P., Eiglmeier K., Marmiesse M., Garnier T., Niemann S., Cole S. T., Brosch R., Billault A. - Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6. *Infection and immunity*, 2002, **70**, 10, 5568-5578.
- Colinon C., Deredjian A., Hien E., Brothier E., Bouziri L., Cournoyer B., Hartman A., Henry S., Jolivet C., Ranjard L., Nazaret S. - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an eCFX qPCR assay. *Journal of applied microbiology*, 2013, **114**, 1734-1749.
- Corner L. A. L., Murphy D., Gormley E. - *Mycobacterium bovis* infection in the Eurasian badger (*Meles meles*): the disease, pathogenesis, epidemiology and control. *Journal of comparative pathology*, 2011, **144**, 1-24.
- Corner L. A. L., O'Meara D., Costello E., Lesellier S., Gormley E. - The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 2012, **194**, 166-172.
- Courtenay O., Reilly L. A., Sweeney F. P., Hibberd V., Bryan S., Ul-Hassan A., Newman C., Macdonald D. W., Delahay R. J., Wilson G. J., Wellington E. M. H. - Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biology letters*, 2006, **2**, 460-462.
- Fine A.E. - The Role of Indirect Transmission in the Epidemiology of Bovine Tuberculosis in Cattle and White-Tailed Deer in Michigan. 2006. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, Michigan State University.
- Fine A. E., Bolin C. A., Gardiner J. C., Kaneene J. B. - A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Veterinary medicine international*, 2011, **2011**, 765430.
- Gallagher J., Clifton-Hadley R. S. - Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Research in veterinary science*, 2000, **69**, 203-217.
- Gallagher J., Monies R., Gavier-Widen M., Rule B. - Role of infected, non-diseased badgers in the pathogenesis of tuberculosis in the badger. *Veterinary Record*, 1998, **142**, 710-714.
- Gavier-Widen D., Chambers M. A., Palmer N., Newell D.G., Hewinson R. G. - Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion. *Veterinary Record*, 2001, **148**(10), 299-304.
- Ghodbane R., Mba Medie F., Lepidi H., Nappez C., Drancourt M. - Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology (Reading, England)*, 2014, **160**(Pt 3), 496-501.
- Goodchild A. V., Clifton-Hadley R. S. - Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2001, **81**, 23-41.
- Huard R. C., Claudio L., Lazzarini D. O., Butler W. R., Soolingen D. Van, Ho J. L. - PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *Journal of clinical microbiology*, 2003, **41**, 1637-1650.
- Ibekwe A.M., Grieve C.M. - Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **94**(3), 421-431.
- Kermekchiev M. B., Kirilova L. I., Vail E. E., Barnes W. M. - Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic acids research*, 2009, **37**, e40.
- Maddock E.C. - Studies on the survival time of the bovine tubercle bacillus in soil, soil and dung, in dung and on grass, with experiments on the

- preliminary treatment of infected organic matter and the cultivation of the organism. *The Journal of Hygiene*, 1933, **33**(1), 103-117.
- Michel A.L., de Klerk L.M., Gey van Pittius N.C., Warren R.M., van Helden P.D. - Bovine tuberculosis in African buffaloes: observations regarding *Mycobacterium bovis* shedding into water and exposure to environmental mycobacteria. *BMC Veterinary Research*, 2007, **3**, 23.
- Neill S., Hanna J., O'Brien J., McCracken R. - Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Veterinary Record*, 1988, **123**, 340-343.
- Opel K. L., Chung D., McCord B. R. - A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of forensic sciences*, 2010, **55**, 25-33.
- Palmer M. V., Whipple D. L., Waters W. R., Mitchell V., Diana L., Ray W., Transmission E. D. - Experimental Deer-To-Deer Transmission of *Mycobacterium bovis* Experimental deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *American journal of veterinary research*, 2001, **62**, 692-696.
- Payne A., Boschioli M. L., Gueneau E., Moyen J. L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J. - Bovine tuberculosis in "Eurasian" badgers (*Meles meles*) in France. *European Journal of Wildlife Research*, 2012, **59**, 331-339.
- Pillai S. D., Widmer K. W., Ivey L. J., Coker K. C., Newman E., Lingsweiler S., Baca D., Kelley M., Davis D. S., Silvy N. J., Adams L. G. - Failure to identify non-bovine reservoirs of *Mycobacterium bovis* in a region with a history of infected dairy-cattle herds. *Preventive veterinary medicine*, 2000, **43**, 53-62.
- Ranjard L., Lejon D.P.H., Mougél C., Schehrer L., Merdinoglu D., Chaussod, R. - Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(11), 1111-1120.
- Richomme C., Boschioli M. L., Hars J., Casabianca F., Ducrot C. - Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean island, Corsica. *Journal of wildlife diseases*, 2010, **46**, 627-631.
- Sweeney F. P., Courtenay O., Ul-Hassan A., Hibberd V., Reilly L. A., Wellington E. M. H. - Immunomagnetic recovery of *Mycobacterium bovis* from naturally infected environmental samples. *Letters in applied microbiology*, 2006, **43**, 364-369.
- Sweeney F. P., Courtenay O., Hibberd V., Hewinson R. G., Reilly L. A., Gaze W. H., Wellington E. M. H. - Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by real-time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Applied and environmental microbiology*, 2007, **73**, 7471-7473.
- Travis E.R., Gaze W.H., Pontiroli A., Sweeney, F.P., Porter D., Mason S., Keeling M.J.C., Jones R.M., Sawyer J., Aranaz A., Rizaldos E.C., Cork J., Delahay R.J., Wilson G.J., Hewinson R.G., Courtenay O., Wellington E.M.H. - An inter-laboratory validation of a real time PCR assay to measure host excretion of bacterial pathogens, particularly of *Mycobacterium bovis*. *PloS One*, 2011, **6**(11), e27369.
- Walter W. D., Anderson C. W., Smith R., Vanderklok M., Averill J. J., Vercauteren K. C. - On-farm mitigation of transmission of tuberculosis from white-tailed deer to cattle: literature review and recommendations. *Veterinary medicine international*, 2012, 2012, 616318.
- Young J. S., Gormley E. & Wellington E. M. H. - Molecular Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in Soil. *Applied and environmental microbiology*, 2005, **71**, 1946-1952.
- Zanella G., Durand B., Hars J., Moutou F., Garin-Bastuji B., Duvauchelle A., Fermé M., Karoui C., Boschioli M. L. - *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *Journal of wildlife diseases*, 2008, **44**, 99-108.

Annexe 2 : Préparation du Middlebrook 7H9

Middlebrook 7H9 supplémenté pour la culture liquide de <i>Mycobacterium bovis</i>
--

Préparation de la base 7H9 (pour 500 mL de milieu):

1. Diluer 2.35 g de Middlebrook 7H9 (Fluka analytical) dans 450 mL d'eau osmosée.
2. Autoclaver 15 min à 120°C

Préparation de l'enrichissement ADC (pour 50 mL) :

1. Peser 2.5 g de BSA, 1 g de Dextrose et 0.005 g de catalase bovine
 2. Ajouter 50 mL d'eau osmosée
 3. Agiter environ 30 min (agitation magnétique modérée pour éviter la formation de mousse)
 4. Filtrer l'enrichissement sur une membrane filtrante de porosité 0.22 µM
- (Conservation 1 mois à 4°C)

Préparation du Middlebrook 7H9 enrichi

1. Après l'autoclavage, une fois le milieu refroidi , ajouter 50 mL d'ADC (conservation 1 mois à 4°C).

Annexe 3 : Préparation du Middlebrook 7H11

Middlebrook 7H11 supplémenté pour la culture de *Mycobacterium bovis*

Préparation des solutions stock (tous les produits ont été fournis par le laboratoire Sigma-Aldrich) :

- Vert malachite 0.6 % : dissoudre 0.3 g dans 50 mL d'eau osmosée
- Ticarcilline/Triméthoprime : peser 1 g ticarcilline et 0.1 g de triméthoprime lactate, ajouter 10 mL d'eau osmosée stérile. Vortexer jusqu'à dissolution, répartir en Eppendorf de 1 mL, congeler (conservation 6 mois à -20°C).
- Cycloheximide : peser 500 mg et dissoudre dans 10 mL d'éthanol absolu (conservation 1 an à 4°C).
- Polymyxine B : dilution dans eau osmosée stérile pour concentration finale de 100 000 UI par mL
- Sang mouton lysé : Mélanger 2.5 mL de sang avec 2.5 mL d'eau osmosée stérile, bain-marie 10 min. à 60°C puis utilisation immédiate.

Préparation de la base 7H11 (pour 1 L de milieu):

1. Diluer 18.9 g de Middlebrook 7H11 (Fluka analytical) dans 781 mL d'eau.
2. Ajouter 1 mL de Vert de malachite 0.6%
3. Ajouter un barreau aimanté dans la bouteille
4. Autoclaver 15 min à 120°C

Préparation de l'enrichissement OADC (pour 100mL) :

1. Peser 5 g de BSA, 2 g de Dextrose, 0.85 g de NaCl et 0.005g de catalase bovine
2. Ajouter 100 mL d'eau osmosée
3. Agiter environ 30 min (agitation magnétique modérée pour éviter la formation de mousse)
4. Ajouter 125 µL d'acide oléique
5. Filtrer l'enrichissement sur une membrane filtrante de porosité 0.22 µM
(Conservation 1 mois à 4°C)

Préparation du Middlebrook 7H11 enrichi

1. Après l'autoclavage, porter le milieu à 45-50°C
2. Ajouter 100 mL de sérum bovin inactivé (agitation magnétique)
3. Ajouter 100 mL d'OADC (agitation magnétique)
4. Ajouter 5 mL de sang de mouton lysé
5. Ajouter 1 mL de Ticarcilline/Triméthoprime, 2 mL de Polymyxine B, 2 mL de cycloheximide, (agitation magnétique) (facultatif si ensemencement de cultures pures)(Concentrations finales respectives : 100 mg/L, 10 mg/L, 200 000 UI/L et 100 mg/L)
6. Répartition de 25 mL de milieu par boîte
(Conservation 1 mois à 4°C)

Résumé : La tuberculose bovine est une maladie infectieuse contagieuse causée par *Mycobacterium bovis*. Cette maladie touche les bovins et de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages, ainsi que l'homme. La circulation de la bactérie dans des systèmes multi-hôtes variés favorise l'entretien de la maladie et la contamination des bovins vivant à proximité des animaux sauvages infectés. En marge de la transmission directe de *M. bovis* par voie respiratoire, la transmission indirecte aux bovins, liée à l'inhalation ou à l'ingestion de matrices environnementales contaminées par un animal infecté excréteur, est suspectée dans plusieurs régions du monde. L'existence de réservoirs environnementaux où le bacille *M. bovis* est capable de persister, pourrait donc être un facteur important de la réémergence puis du maintien de la maladie dans les systèmes multi-hôtes.

En Côte d'Or, département fortement touché par la tuberculose bovine depuis 2004, la transmission indirecte de la bactérie entre la faune sauvage infectée et les bovins est suspectée dans plusieurs élevages. Pour évaluer la présence et la survie de cette bactérie dans l'environnement, nous avons analysé un grand nombre d'échantillons prélevés dans des zones partagées par les bovins et/ou la faune sauvage infectés dans le but de déterminer la distribution environnementale de *M. bovis*. Pour ce faire, nous avons développé ou modifié des systèmes de détection moléculaire adaptés aux matrices environnementales complexes. Nous avons également évalué l'impact de la température et des propriétés physico-chimiques de deux sols sur la survie de *M. bovis*, ainsi que le rôle de la mésofaune du sol (lombrics en particulier) dans la dissémination de la bactérie à partir de matière organique contaminée. L'étude environnementale a mis plus particulièrement en évidence la contamination de deux biotopes: les zones humides des pâtures et les sols de terriers de blaireaux. De plus, les études expérimentales ont montré que *M. bovis* pouvait survivre plusieurs mois dans le sol à 4°C et que les lombrics pouvaient disséminer la bactérie dans le sol, voire jouer un rôle potentiel de vecteur pour les animaux qui les consomment. Ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur la persistance et la circulation de *M. bovis* dans l'environnement en Côte d'Or et permettront de proposer des améliorations aux mesures de biosécurité déjà existantes dans les élevages bovins.

Mots Clés : *Mycobacterium bovis*, environnement, sol, eau, fèces, bovins, faune sauvage, qPCR, culture

Abstract : Bovine tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*. This disease affects multiple species of domestic livestock, notably cattle, wild mammals, and humans. The circulation of the bacteria within complex multi-host systems promotes the maintenance of the disease and the reinfection of cattle. Besides the classical, direct transmission of the bacteria through the respiratory route, indirect transmission, through inhalation or ingestion of environmental substrates contaminated by the excretions of infected animals, is suspect in several countries. Environmental contamination with *M. bovis* appears to be a crucial factor in the persistence of the infection in multi-host systems.

In Côte d'Or, a French department impacted by bovine tuberculosis since 2004, the indirect transmission of the bacteria from infected wildlife to cattle is now suspect in several cases. To assess this mode of transmission, we evaluated environmental contamination with *M. bovis* on a large number of samples collected in areas shared by cattle and infected wildlife. For this purpose, we both developed and modified molecular detection systems adapted for complex environmental substrates. We also assessed the impact of temperature and soil physicochemical properties on the survival of *M. bovis* as well as the role of earthworms in the dissemination of the bacteria from contaminated organic material. The environmental study showed contamination of two habitats in particular: wetland pastures and soil badger setts. Moreover, results indicated that *M. bovis* can survive in soil for several months at 4°C, and that worms may disseminate the bacteria in the soil and even serve as a vector for the mammals that consume them. This study increases our understanding of the persistence and the circulation of *M. bovis* in the environment in Côte d'Or. In addition, these results will be used to improve the existing biosecurity measures on cattle farms in the region.

Key words: *Mycobacterium bovis*, environment, soil, water, feces, cattle, wildlife, qPCR, culture