

Tuberculose bovine en France : cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000-2013

Maria Laura Boschioli (1) (maria-laura.boschioli@anses.fr), Lorraine Michelet (1), Amandine Hauer (1,3), Krystel de Cruz (1), Aurélie Courcoul (2), Sylvie Hénault (1), Aurore Palisson (2,3), Claudine Karoui (1), Franck Biet (4), Gina Zanella (2)

(1) Anses, Laboratoire de santé animale, Unité Zoonoses bactériennes, Maisons-Alfort, France

(2) Anses, Laboratoire de santé animale, Unité Épidémiologie, Maisons-Alfort, France

(3) Université Paris Sud, Villejuif, France

(4) Inra, UMR1282, Infectiologie et Santé publique (ISP-311), Nouzilly, France

Résumé

Le génotypage de souches de *Mycobacterium bovis* fournit des informations qui permettent de suivre la transmission de la tuberculose bovine dans l'espace et dans le temps. Les génotypes de la collection de souches de *M. bovis* isolées dans les foyers bovins en France entre 2000 et 2013 ont été analysés par spoligotypage et typage VNTR. Parmi les 976 souches étudiées, 163 génotypes différents ont pu être déterminés, dont six représentaient presque la moitié de la totalité des souches de l'étude. Les génotypes restants étaient peu représentés pendant la période mais la régionalisation demeure une caractéristique clef. Les souches prédominantes, dont la plupart sont également présentes dans la faune sauvage, persistent pendant toute la période, s'amplifiant par expansion clonale localement et semblant se pérenniser. Des fluctuations dans la variabilité génétique de *M. bovis* au cours du temps ont été constatées, avec une diminution de la diversité au milieu de la période étudiée. Néanmoins, une tendance à l'augmentation du nombre de génotypes a été observée pendant la sous-période 2009-2013, sans doute lié à l'amélioration de la surveillance au niveau national depuis la mise en place du nouveau plan de lutte en novembre 2011 qui a permis de détecter davantage de foyers. Cette grande variabilité génétique couplée à la forte régionalisation de génotypes fait du typage moléculaire un outil très puissant pour établir des hypothèses sur l'origine des foyers, mais également pour étudier les profils de transmission de l'infection et ainsi reconnaître les régions potentiellement à problème afin d'éviter sa propagation.

Mots-clés

Tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, génotypage, diversité génétique, expansion clonale

Abstract

Bovine tuberculosis in France: mapping strains of *Mycobacterium bovis* over the 2000-2013 period

*Genotyping of *Mycobacterium bovis* provides information for following bovine tuberculosis transmission in space and time. The genotypes from the collection of *M. bovis* strains isolated from cattle outbreaks in France from 2000 to 2013 were analysed by spoligotyping and VNTR typing. Within the 976 strains studied, 163 different genotypes were found, six of which represent almost half of all the strains included in this study. The rest of the genotypes were less common throughout the period, but their regionalisation remained a common feature. The predominant strains, most of which are also found in wildlife, were seen throughout the period, proliferating locally through clonal expansion in endemic areas. Fluctuations of the genetic variability of *M. bovis* were observed over time, with a decrease in diversity found in the middle of the period studied. However, the number of genotypes tended to increase in the 2009-2013 sub-period, probably due to improved surveillance on the national level following implementation of a new control program launched in 2010 that enabled the detection of higher numbers of outbreaks. This great genetic variability coupled with the strong regionalisation of the genotypes makes molecular typing a powerful tool not only for establishing hypothetical outbreak origins, but also for studying the disease's transmission patterns and identifying regions with potential problems in order to its dissemination.*

Keywords

*Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, Genotyping, Genetic diversity, Clonal expansion*

Le génotypage des souches de *Mycobacterium bovis* permet d'étudier la dynamique de la tuberculose bovine et de mieux comprendre sa nature complexe en apportant des éléments pour déchiffrer l'origine des foyers. Les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, auquel appartiennent *Mycobacterium bovis*, ainsi que *Mycobacterium caprae* et *Mycobacterium tuberculosis* considérées également comme des agents de la tuberculose bovine, sont d'excellents microorganismes pour réaliser des études d'épidémiologie moléculaire sur la base de leurs caractères génotypiques. En effet, du fait de leur reproduction asexuée et de l'absence d'échange de matériel génétique entre elles, ces mycobactéries sont très clonales, c'est-à-dire qu'elles conservent des caractéristiques identiques à leur ancêtre le plus récent. Si une de ces bactéries passe d'un animal à un autre, elle conserve toutes ses caractéristiques génotypiques dans le nouvel hôte. Si une souche subit des mutations génétiques dans la région ciblée par le génotypage, celui-ci est donc capable de la différencier de son ancêtre : on considère qu'il s'agit d'un nouveau clone. Si deux animaux sont atteints de tuberculose et qu'une bactérie de génotype différent est isolée chez chacun d'eux, on peut ainsi en déduire qu'il n'y a pas eu de transmission entre eux, même s'ils ont été en contact étroit.

La technique de génotypage utilisée doit être en relation avec le taux de variation génétique de la bactérie. Dans le cas de la tuberculose bovine et en particulier de *M. bovis*, deux méthodes de génotypage

ont été choisies et sont largement utilisées : le spoligotypage et le typage VNTR (Encadré), qui permettent d'établir une différenciation entre souches de mycobactéries en tenant compte d'une relative stabilité génétique. La combinaison de ces deux techniques permet une différenciation très fine des souches ; ainsi 497 génotypes différents ont pu être identifiés en France entre 1978 et 2013 à partir de souches de *M. bovis* isolées dans des foyers bovins et chez des animaux sauvages (Hauer *et al.*, 2015).

Le génotypage aide à la reconstruction de possibles séquences d'infection, très difficiles à établir dans une maladie comme la tuberculose où l'animal peut héberger le bacille parfois pendant de longues périodes et être contagieux sans pour autant être identifié comme étant infecté. Si des informations épidémiologiques en lien avec un foyer sont disponibles, une chaîne de transmission peut éventuellement être établie, mais si elles sont absentes l'exercice s'avère impossible. Tel est le cas pour le décryptage du cycle de transmission faune domestique - faune sauvage. Les études dans la faune sauvage n'ont commencé qu'en 2000 en Forêt de Brotonne, en Normandie, où la prévalence de l'infection dans la faune sauvage était déjà élevée au moment de sa découverte et présente probablement depuis plusieurs années. Ultérieurement, grâce au dispositif Sylvatub (Rivière *et al.*, 2013), des études ciblées dans la faune sauvage ont été mises en place dans des régions avec un nombre croissant de foyers

Encadré. Le génotype d'une souche de *M. bovis* est déterminé par l'utilisation en parallèle de deux techniques de typage moléculaire, le spoligotypage et le typage VNTR

Spoligotypage

C'est méthode la plus utilisée pour génotyper des souches de *M. bovis*. Elle permet d'identifier le polymorphisme dans une zone du génome appelée DR (Direct Repeats) caractérisée par la présence ou l'absence de séquences appelées *espaces* (spacers). La position de chaque spacer dans la région DR est très conservée. La région DR est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) et la caractérisation de la souche est basée sur la détection ou l'absence de détection de 43 spacers. Les profils obtenus sont déterminés d'après la base internationale Mbovis.org. La région DR étant très stable, les profils de spoligotypage permettent de reconstruire des événements évolutifs de manière assez fiable.

La base de données internationale Mbovis.org, a permis d'homogénéiser la nomenclature des profils (SB suivi de 4 chiffres). Cette nouvelle nomenclature remplace des nomenclatures spécifiques jusqu'alors utilisées dans les différents pays. Par exemple, certaines anciennes nomenclatures « GB » dessinaient des profils décrits originalement en Grande Bretagne; les profils « F » étaient ceux décrits pour la

première fois en France. Quant au profil « BCG », celui-ci correspond initialement au profil DR de la souche vaccinale de *M. bovis*, mais il n'est pas exclusif de cette souche et il est également observé dans des souches de terrain à l'origine de foyers.

Typage-VNTR

La technique VNTR (Variable Number Tandem Repeats) identifie les séquences répétées en tandem en nombre variable. Cette technique utilise l'amplification par PCR de ces régions. En France, huit régions génomiques sont caractérisées, dont six sont utiles pour comparer des souches d'origines géographiques différentes comme préconisé par le consortium européen VenoMYC et deux autres qui ont été identifiés comme étant très variables pour les souches françaises (Hauer *et al.*, 2015). Pour chaque souche de *M. bovis*, le résultat est donné sous forme d'une chaîne de caractères à huit chiffres qui définissent le profil de la souche. Ces zones génomiques ayant un taux de changement plus rapide que la zone DR, les profils VNTR permettent une analyse plus fine des souches.

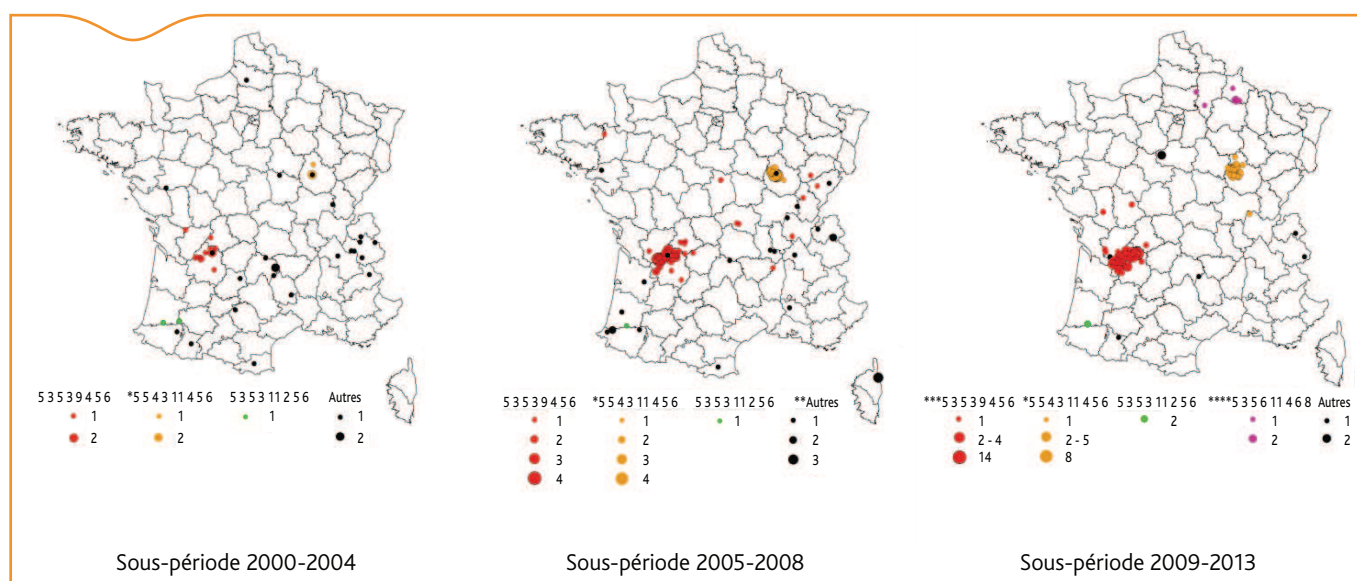


Figure 1. Nombre de souches de *Mycobacterium bovis* appartenant au spoligotype BCG (SB0120) par profil de VNTR entre 2000 et 2013; données cumulées par commune sur les trois sous-périodes. VNTR aussi identifié chez la faune sauvage en *Côte-d'Or, en **Corse, en ***Dordogne, en ***Charente et dans ****les Ardennes

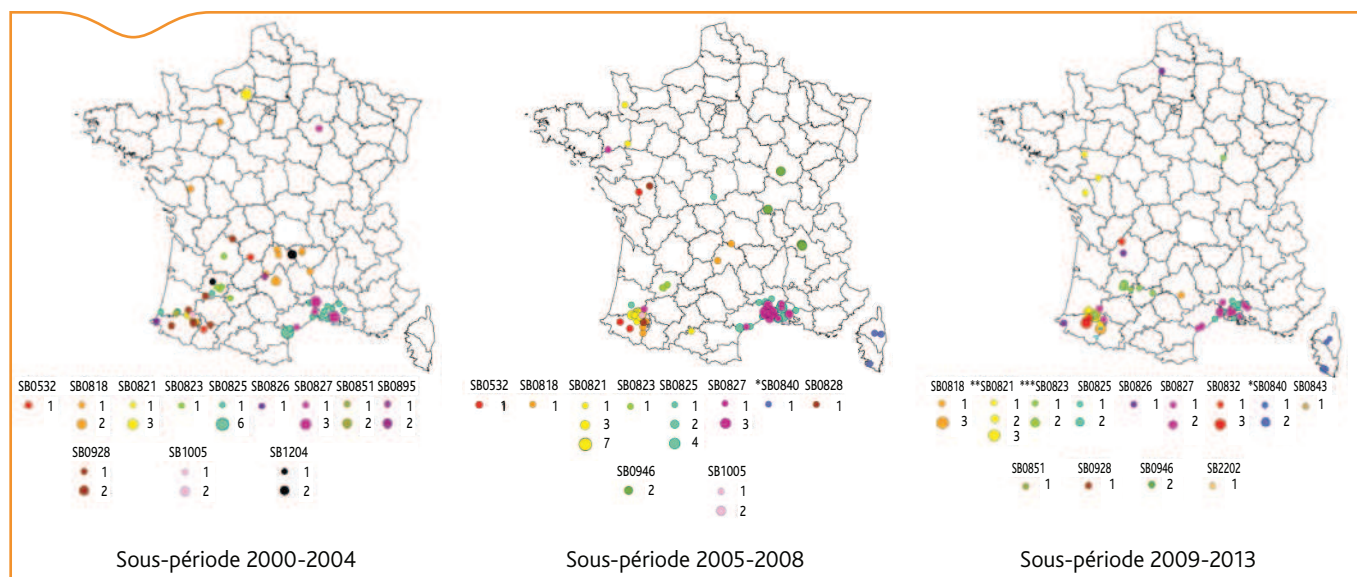


Figure 2. Nombre de souches de *Mycobacterium bovis* appartenant à la famille F4 par spoligotype entre 2000 et 2013; données cumulées par commune sur les trois sous-périodes. Spoligotype aussi identifié chez la faune sauvage en *Corse, dans les **Pyrénées Atlantiques, le ***Lot-et-Garonne

bovins, et de manière systématique dans d'autres régions où des foyers bovins ont été mis en évidence à partir de 2011. Le génotypage est complémentaire des enquêtes épidémiologiques classiques et permet parfois de confirmer les origines de foyers quand il s'agit d'introduction d'animaux, de résurgence ou par contact du fait du voisinage. Vu la forte capacité de pérennisation de l'infection par *M. bovis* localement ainsi que la grande stabilité des marqueurs génétiques, il est facile de pouvoir établir des résurgences parfois au-delà de vingt ans quand on connaît le cheptel auquel appartient l'animal d'où la souche a été isolée. Les renseignements apportés par les enquêtes épidémiologiques sur des longues périodes, croisés avec les données de génotypage des souches isolées sont donc essentiels pour déterminer les origines possibles des foyers.

En France, d'importantes fluctuations de la variabilité génétique de *M. bovis* ont été constatées au cours du temps et selon la zone géographique, avec une diminution globale de la diversité des souches au cours des quinze dernières années, qui peut s'expliquer par la diminution de la prévalence de l'infection au niveau national (Hauer *et al.*, 2015).

Cet article décrit la distribution spatio-temporelle de souches de *M. bovis* isolées dans des foyers bovins entre 2000 et 2013. Au cours de cette période, la France a atteint les niveaux les plus faibles de prévalence et d'incidence de la maladie avec cependant des valeurs à la hausse au cours des dernières années. Par ailleurs, durant cette période, toutes les souches de *M. bovis* identifiées au laboratoire

national de référence (LNR Tuberculose, Anses, Maisons-Alfort) étaient systématiquement accompagnées de fiches de commémoratifs qui incluent les informations permettant l'identification du bovin infecté et du cheptel d'origine. Ces informations, souvent absentes avant 2000, ont permis d'établir des cartes de foyers par commune.

Matériel et méthode

Dans notre analyse, nous avons inclus les souches de *M. bovis* isolées dans les foyers de tuberculose bovine répertoriés par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) entre 2000 et 2013. Une seule souche a été prise en compte par animal. Ces souches ont été typées par spoligotypage systématiquement et par typage VNTR selon la sélection suivante: si plusieurs souches de même spoligotype étaient isolées dans un même cheptel, le typage VNTR a été réalisé sur au moins deux souches par an s'il s'agissait de cheptels infectés depuis plus d'un an (c'est par exemple le cas de certains cheptels en cours d'assainissement par abattage sélectif). Un génotype de *M. bovis* est donc une combinaison d'une donnée de spoligotypage et de typage VNTR. Afin de mieux décrire l'évolution spatio-temporelle des souches, l'analyse a été faite par sous-périodes choisies de façon arbitraire: 2000-2004, 2005-2008 et 2009-2013 (Tableau 1). Nous avons d'une part analysé les génotypes des souches de spoligotypes qui correspondent aux principaux groupes clonaux en France (Hauer *et al.*, 2015): SB0120 (BCG), SB0134 (GB35), SB0121 (GB54) et la famille F4. D'autre part nous avons également analysé des souches de type britannique, appartenant au complexe clonal Eu1 (Smith *et al.*, 2011). Nous avons défini dans cette étude un groupe de « autres » souches qui possèdent des génotypes distincts en spoligotypage et en VNTR et qui ont été trouvées au moins quatre fois pendant la période globale, et au cours de deux sous-périodes ou plus. Le groupe de souches « ponctuels » est composé de souches avec des génotypes distincts en spoligotypage des autres groupes décrits précédemment, trouvées jusqu'à trois fois au cours de la période globale, mais ponctuellement dans une seule sous-période.

Pour les groupes principaux SB0120 (BCG), SB0134 (GB35), SB0121 (GB54), les « autres génotypes » correspondent aux profils VNTR qui n'ont pas été trouvés plus de trois fois dans la période globale.

Les cartes ont été construites à l'aide du logiciel ArcGIS 9.

Tableau 1. Nombre de souches incluses dans l'étude, isolées entre 2000 et 2013

Groupe de spoligotype	2000-2004	2005-2008	2009-2013	Total 2000-2013
SB0120 (BCG)	46	130	183	359
Famille F4	70	128	110	308
SB0134(GB35)	24	11	59	94
SB0121 (GB54)	25	16	29	70
Complexe Eu1	5	4	5	14
Autres	22	10	13	45
Ponctuels	48	13	25	86
Total	240	312	424	976

Tableau 2. Nombre de génotypes différents par groupe de souches incluses dans l'étude, entre 2000 et 2013

Groupe de spoligotype	2000-2004	2005-2008	2009-2013	Total 2000-2013
SB0120 (BCG)	25	21	16	54
Famille F4	12	10	13	16
SB0134(GB35)	5	6	4	8
SB0121(GB54)	11	5	8	20
Complexe Eu1	2	2	2	3
Autres	6	4	6	8
Ponctuels	31	8	20	54
Total	92	56	69	163

Tableau 3. Génotypes de *M. bovis* prépondérants dans la collection de cette étude

Spoligotype	Génotype		Région principale	Nombre de souches (% sur le total)
	VNTR			
SB0120 (BCG)	5 3 5 3 9 4 5 6		Dordogne	142 (14,6)
SB0120 (BCG)	5 5 4 3 11 4 5 6		Côte-d'Or	83 (8,5)
SB0825 (F61)			Camargue	68 (7,2)
SB0134 (GB35)	6 4 5 3 6 4 3 6		Côte-d'Or	60 (6,1)
SB0827 (F23)			Camargue	53 (5,4)
SB0821 (F7)			Pyrénées-Atlantiques	50 (5,1)
Total				456 (46,9)

Résultats

Variabilité génétique dans le temps

Des fluctuations dans la variabilité génétique de la mycobactérie ont été observées au cours du temps. Une importante diminution de la diversité étudiée a été constatée au milieu de la période. Néanmoins, une tendance à l'augmentation du nombre de génotypes a de nouveau été observée à partir de 2009, notamment en lien avec une recrudescence de souches de type « ponctuels » (Tableau 2).

Distribution de principaux groupes de souches

Parmi les 976 souches étudiées, 163 génotypes différents ont pu être déterminés, dont six représentaient presque la moitié de la totalité des souches de l'étude (Tableau 3).

Description détaillée des génotypes par groupe de spoligotypes

Groupe SB0120 (BCG) (Figure 1)

Cinquante-quatre génotypes appartenant à ce groupe ont pu être répertoriés entre 2000 et 2013 (Tableau 2). L'augmentation du nombre de souches d'une sous-période à l'autre (Tableau 1) est la conséquence d'une prolifération très régionalisée de deux génotypes principaux en Côte-d'Or (VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6, en jaune) et en Dordogne (VNTR 5 3 5 3 9 4 5 6, en rouge) (Tableau 3). Le génotype principal de la Côte-d'Or n'a été trouvé qu'une seule fois dans un autre département entre

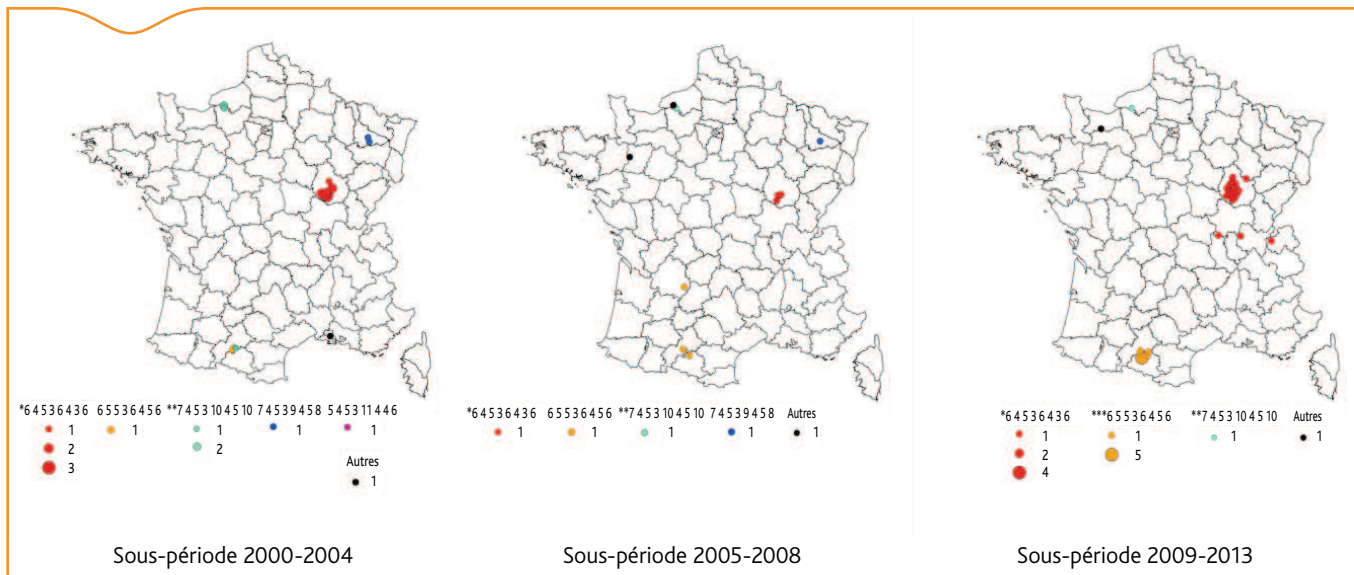


Figure 3. Nombre de souches de *Mycobacterium bovis* appartenant au spoligotype GB35 (SB0134) par profil de VNTR entre 2000 et 2013 ; données cumulées par commune sur les trois sous-périodes. VNTR aussi identifié chez la faune sauvage en *Côte-d'Or, en **Normandie et en ***Ariège

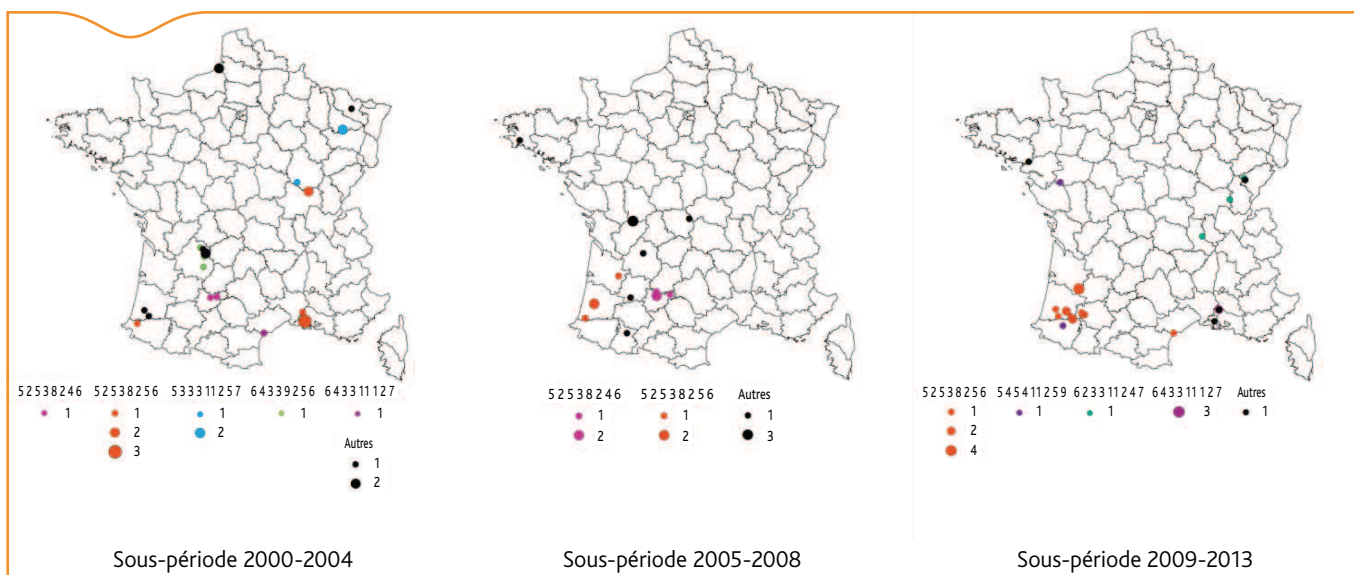


Figure 4. Nombre de souches de *Mycobacterium bovis* appartenant au spoligotype GB54 (SB0121) par profil de VNTR entre 2000 et 2013 ; données cumulées par commune sur les trois sous-périodes

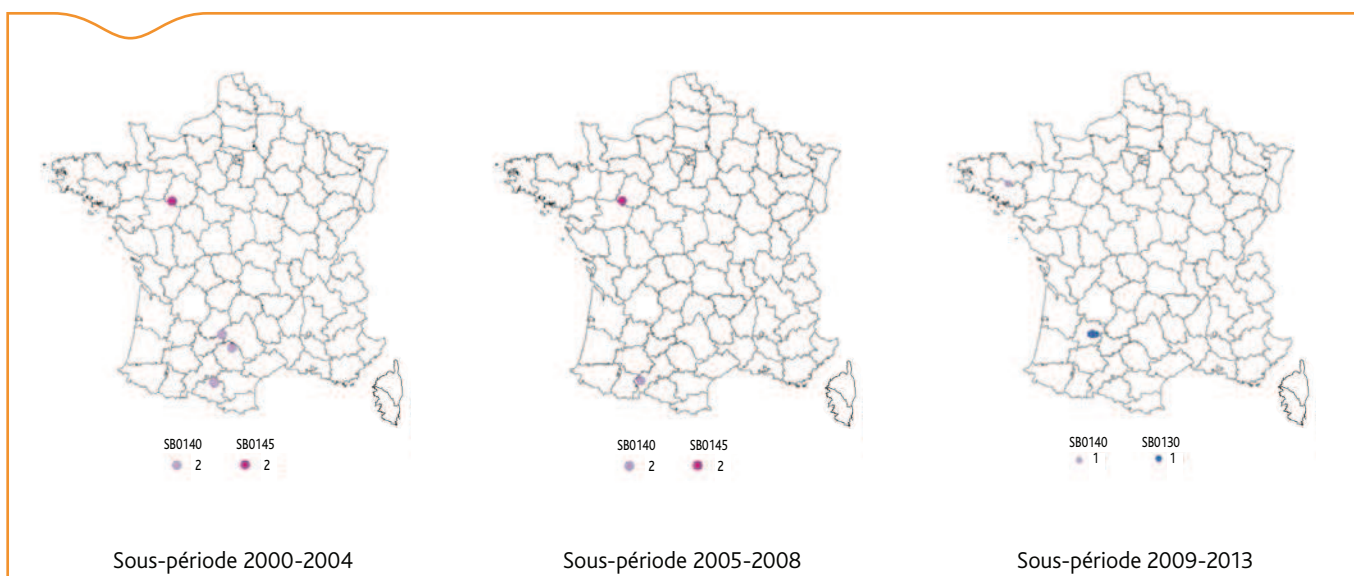


Figure 5. Nombre de souches de *Mycobacterium bovis* appartenant au complexe Eu1 par spoligotype entre 2000 et 2013 ; données cumulées par commune sur les trois sous-périodes

2009 et 2013 (Figure 1). On observe la présence du même génotype trouvé en Dordogne dans des communes de départements limitrophes comme la Charente, la Haute-Vienne et la Corrèze entre 2000 et 2004, tandis que pour la deuxième sous-période, il se retrouve dans huit autres départements éloignés. Puis finalement, au cours de la troisième sous-période l'infection par cette souche se cantonne à nouveau principalement à la Dordogne. Un autre génotype (VNTR 5 3 5 3 11 2 5 6, en vert) est présent dans les Landes au cours des trois sous-périodes et dans une commune des Pyrénées-Atlantiques au cours de la première sous-période. Le génotype qui apparaît en 2009-2013 dans les Ardennes (VNTR 5 3 5 6 11 4 6 8, en fuchsia), est également retrouvé dans les départements de l'Aisne et de l'Oise. Par ailleurs, les nombres d'« autres génotypes » tendent à diminuer.

Les profils de souches en expansion clonale (ceux de Côte-d'Or, de Dordogne et des Ardennes), c.à.d. une souche unique qui diffuse localement en élargissant son territoire, ont tous été retrouvés dans la faune sauvage locale.

Famille F4 (Figure 2)

La famille F4 est un groupe défini par des caractéristiques génétiques particulières mises en évidence par les méthodes de typage. Entre 2000 et 2013, seize des vingt-cinq spoligotypes différents qui caractérisent cette famille (Hauer *et al.*, 2015) ont pu être retrouvés. Pour cette famille, les types VNTR sont très conservés par spoligotype, dès lors les génotypes décrits prennent le nom des profils de spoligotype. Comme pour le groupe SB0120 (BCG), le nombre de souches isolées appartenant à la famille F4 a nettement augmenté au cours du temps. En effet, suite à la surveillance renforcée dans le Sud-Ouest, le nombre de souches d'un génotype en particulier a augmenté, celui du spoligotype SB0821 (F7), très amplement répandu dans une zone limitrophe du sud-est des Landes et du nord-est des Pyrénées-Atlantiques (Figure 2) et également détecté dans la faune sauvage de cette zone. Ce génotype en particulier, a également été retrouvé dans des départements distants, toujours en lien avec des animaux ayant été introduits à partir de ces régions du Sud-Ouest. D'autres génotypes comme le SB0840 (F1) en Corse et le SB0823 (F41) dans le Lot et Garonne, très présents localement, ont également affecté des espèces sauvages. La famille F4 se caractérise par la présence d'autres génotypes très locaux, comme les types SB0818 (F15) et SB1005 dans les Pyrénées-Atlantiques, et les types SB0827 (F23) et SB0825 (F61) rencontrés en Camargue. À la différence d'autres génotypes de la famille F4, une nette augmentation des souches provenant de Camargue est observée dans la sous-période 2005-2008 ceci étant lié à l'amélioration de la détection grâce à l'introduction du test IFN γ depuis 2004 (Keck *et al.*, 2012); la réduction du nombre de ces souches pendant la sous-période 2009-2013 (Figure 2) tient au succès de l'assainissement réalisé dans cette région.

SB0134 (GB35) (Figure 3)

Ce groupe présente une variabilité génotypique plus limitée que celle des deux groupes précédents avec seulement huit génotypes isolés entre 2000 et 2013. *A contrario* de ces deux groupes, une diminution du nombre de souches a été constatée dans la deuxième sous-période suivie d'une nette augmentation lors de la troisième sous-période (Figures 3 et Tableau 1). On observe deux profils principaux qui sont celui de l'Ariège (VNTR 6 5 3 6 4 5 6, en jaune) et celui de la Côte-d'Or (VNTR 6 4 5 3 6 4 3 6, en rouge) en nette augmentation dans la dernière sous-période. Ces deux profils ont atteint la faune sauvage de ces deux départements (Hars *et al.*, 2012).

SB0121 (GB54) (Figure 4)

Les souches de ce groupe appartiennent au complexe clonal Eu2, groupe principal pour la péninsule ibérique (Rodriguez-Campos *et al.*, 2012b) mais également bien présent en France. La variabilité des souches est importante par rapport au groupe SB0134 (GB35) (Tableau 2), vingt génotypes au total ont été identifiés dans cette étude, dont certains semblent avoir une localisation régionale mais ils n'ont pas nécessairement été observés au cours de toutes les sous-périodes. Ici encore, on observe une diminution sur la deuxième sous-période

en nombre et en variabilité des souches, avec la constatation d'une augmentation en troisième période notamment dans le Sud-Ouest (VNTR 5 2 5 3 8 2 5 6, en orange), qui serait liée à un réseau d'échanges commerciaux dans cette zone. Trois des « autres génotypes » de ce groupe ont été isolés à partir d'animaux en provenance d'Espagne. À ce jour, aucune souche de ce groupe n'a été trouvée chez la faune sauvage.

Complexe European 1 (Figure 5)

Le groupe du complexe Eu1 est dominant dans les Iles britanniques mais il est présent également en France, chez des bovins français. Ces souches ne prolifèrent pas mais elles ont été observées ponctuellement pendant toute la période.

Ce groupe est le moins représenté de tous avec un nombre faible et constant de souches isolées présentant une certaine variabilité génétique, dont trois spoligotypes différents pour un total de quatorze souches de 2000 à 2013.

Autres spoligotypes (Figure 6)

Ce groupe est constitué par des génotypes caractéristiques, uniques par leur spoligotype et profil VNTR, sans rapport avec les groupes précédents tout au moins vis-à-vis de ces deux techniques de caractérisation moléculaire. Certaines de ces souches (SB0999, SB0853, SB0819, SB0089, SB0837) persistent ou resurgissent entre 2000 et 2013 et restent très régionalisées. Une de ces souches, la SB0999, isolée fréquemment dans une zone du nord du Lot et le sud de la Dordogne, circule également dans la faune sauvage locale.

Spoligotypes ponctuels (Figure 7)

Ce groupe hétérogène est constitué de 54 génotypes dont les spoligotypes sont différents des groupes de souches françaises décrites auparavant. Le Tableau 2 et la Figure 7 montrent que ce type de souches était très disséminé en France au début de la période étudiée. Une diminution de la diversité génétique est intervenue au cours de la deuxième sous-période, mais ce phénomène s'est inversé pendant les cinq dernières années (Tableau 2 et Figure 7). L'analyse phylogénétique de souches par spoligotypage et la présence d'un profil VNTR identique ont permis d'établir que douze génotypes ponctuels étaient très proches des génotypes majoritaires donc que ces souches dérivent directement de souches prépondérantes entre 2000 et 2013. Quatre génotypes ont été isolés à partir de bovins en provenance d'autres pays européens et notamment d'Espagne, ou de bovins nés en France mais ayant été en contact avec des animaux étrangers. Ces génotypes « étrangers » sont par ailleurs très fréquents dans ces pays d'origine. Treize autres génotypes avaient été déjà décrits avant 2000, indiquant ainsi des cas de résurgence. En revanche, 25 génotypes sont originaux et il est difficile d'établir un lien avec d'autres profils génotypiques en France ou à l'étranger, faute de données permettant de relier ces foyers à de possibles introductions d'animaux en provenance d'autres pays.

Discussion

Deux situations assez contrastées sont retrouvées parmi la population des souches ayant provoqué des foyers de tuberculose bovine en France au cours des quatorze années étudiées. D'une part, presque la moitié des souches isolées entre 2000 et 2013 représentent un nombre réduit de génotypes; ces génotypes sont très localisés et semblent se pérenniser dans certaines régions. Bien qu'ils aient pu être observés également dans d'autres régions, cette propagation étant certainement liée aux mouvements d'animaux, leur expansion clonale est uniquement observée dans leurs régions d'origine. Quelles sont donc les raisons des expansions clonales des génotypes prépondérants dans leur région d'origine? Une hypothèse pourrait être l'acquisition de mutations qui les rendrait plus virulentes ou transmissibles, ce qui pourrait aussi expliquer leur passage à la faune sauvage. Néanmoins, le faible nombre de bovins infectés par ces souches, et qui présentent des lésions à l'abattoir, ne semble pas étayer cette hypothèse (Fediaevsky *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'absence d'expansion clonale de ces souches dans d'autres régions ne va pas dans le sens d'une capacité accrue de leur transmissibilité. D'autres facteurs pourraient être mis en

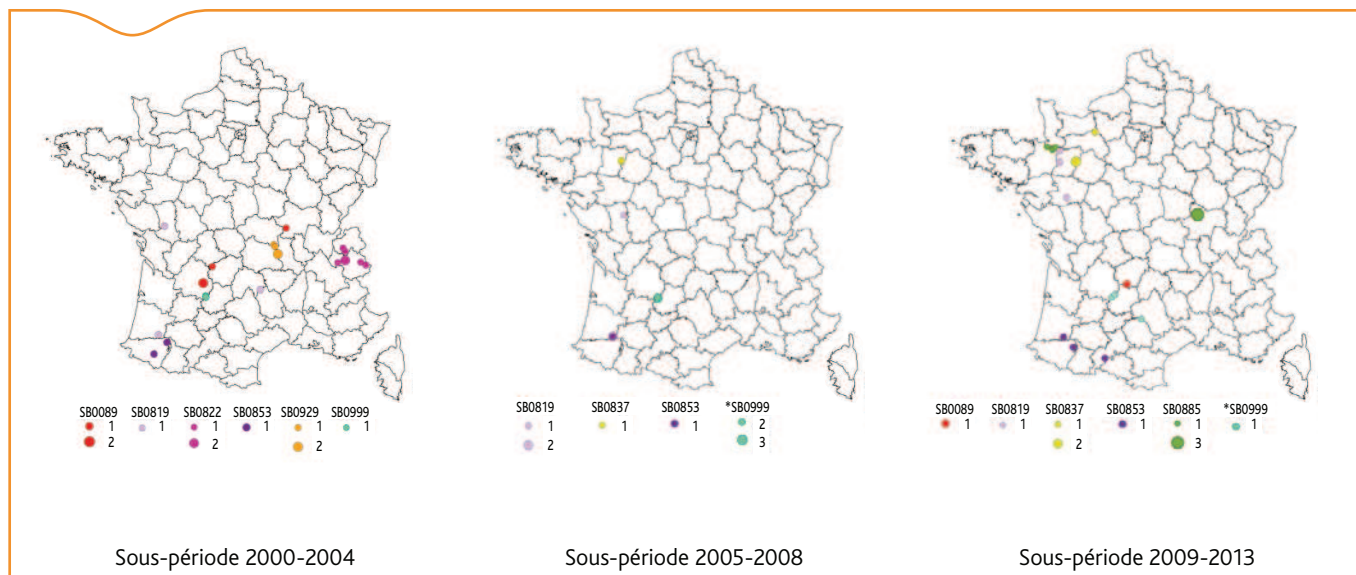


Figure 6. Nombre de souches de *Mycobacterium bovis* « autres » avec des spoligotypes n'appartenant à aucun groupe précédemment décrit entre 2000 et 2013; données cumulées par commune sur les trois sous-périodes. Spoligotype aussi identifié chez la faune sauvage en *Dordogne

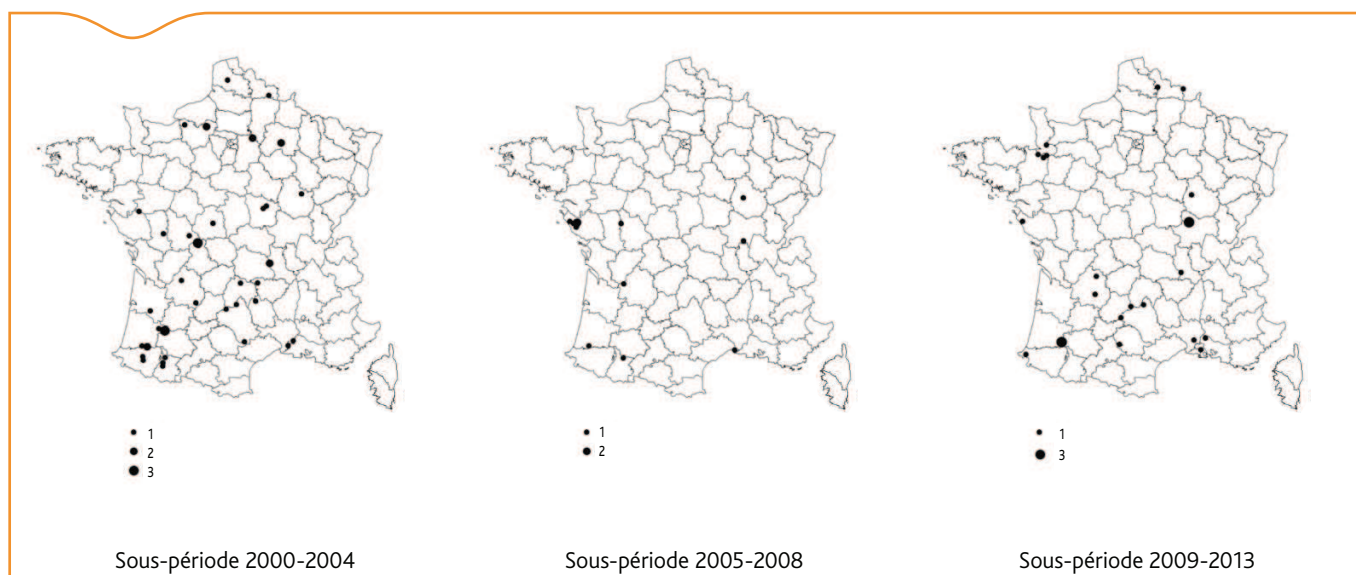


Figure 7. Nombre de souches de *Mycobacterium bovis* « ponctuelles » dont les spoligotypes n'ont été trouvés qu'une seule fois entre 2000 et 2013 ; données cumulées par commune sur les trois sous-périodes

avant pour expliquer la propagation locale de ces souches, dont des facteurs épidémiologiques. En effet, la contamination de la plupart des élevages allaitants où la tuberculose sévit largement, se produirait très probablement au pâturage. Le parcellaire imbriqué qui amène des contacts plus fréquents entre animaux, peut conduire au phénomène de diffusion locale de la maladie (Dommergues *et al.*, 2012). La faune sauvage étant très dense dans certaines zones et ayant libre accès au pâturage, a donc de grandes chances d'entrer en contact direct ou indirect avec les bovins à l'herbe, ce qui contribue sans doute à la diffusion locale de l'infection (Courcoule *et al.*, 2013).

D'autre part, l'autre moitié des souches isolées entre 2000 et 2013 ont des génotypes très variés et peu représentés. Ces génotypes sont également très dispersés sur le territoire. Les souches ponctuelles, assez nombreuses dans la première sous-période ont été moins nombreuses dans la deuxième sous-période. L'augmentation du nombre de génotypes constatée dans la troisième sous-période pourrait s'expliquer par une meilleure détection des foyers dans tout le territoire, comme c'est le cas pour les régions à génotypes majoritaires (SB0120, SB0121, SB0134, famille F4) grâce à la surveillance renforcée instaurée avec le nouveau plan de lutte, en place depuis novembre 2010 (http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Plan_action_tuberculose_

bovine_v2_2012_06_18_cle8e5188.pdf). L'apparition ou réapparition de ce type de souches est tout aussi préoccupante que la prolifération des génotypes majoritaires. En effet, pour la plupart, ces souches de génotypes ponctuels sont soit dérivées des souches de génotypes prédominants décrits dans cette étude, soit de souches de génotypes déjà observés avant la période étudiée, soit des souches de génotypes d'origine inconnue décrits dans cette période pour la première fois. Dans le premier cas, les souches ont eu le temps de cumuler des mutations, de changer et se différencier de leur ancêtre, indiquant que le programme de surveillance et de contrôle supposé éliminer la souche mère n'a pas été efficace. Dans le deuxième cas, c'est la qualité du dépistage et de l'assainissement appliqués dans certaines régions, qui pourrait être mise en cause car les souches sont retrouvées plus tardivement et très souvent dans ces mêmes régions. Quelques souches en provenance de l'étranger, principalement d'Espagne, sont également recensées dans ce groupe. Quant aux souches de génotypes d'origine inconnue décrits dans cette période pour la première fois, il pourrait s'agir d'une combinaison des raisons précédentes. Pour les « autres » génotypes, ce sont des souches très localisées trouvées pendant toute la période à plusieurs reprises sans pour autant que le phénomène d'expansion clonale ne soit observé contrairement à ce

qui est observé pour les souches de génotypes prédominants. Pour autant, l'infection persiste dans le temps et dès lors, on peut également évoquer un défaut du dépistage et de l'assainissement localement.

Malgré les très bons résultats de discrimination de souches, les méthodes de génotypage employées trouvent leurs limites pour expliquer la transmission dans les régions où une même souche est retrouvée dans les foyers comme c'est le cas pour les six génotypes principaux. En effet, pour adapter les mesures de contrôle actuelles au niveau local, de nouvelles méthodes de typage très discriminantes basées sur le séquençage du génome complet des bactéries, sont à envisager (Biek *et al.*, 2012).

Compte tenu de l'échelle nationale de cette étude, le contexte complexe de certains départements où plusieurs souches dominantes subsistent et prolifèrent localement ne peut pas être bien représenté. L'ensemble de données de génotypage est disponible pour les Coordonnateurs régionaux tuberculose et les membres des Cellules interrégionales d'épidémiologie vétérinaire (Cirev) qui dans leurs bilans réguliers réalisent des cartographies régionales très informatives. Les contextes épidémiologiques locaux basés sur les génotypes de souches étant plus détaillés, les tendances de diminution ou augmentation de la propagation de certains génotypes sont d'autant plus claires et des mesures de contrôle adaptées peuvent alors être mises en place.

Une base des données incluant les génotypes des souches de la faune sauvage pourrait à court terme être créée et accessible pour les gestionnaires sanitaires comme c'est le cas en Espagne, où ce type d'outil existe depuis 2012 (Rodriguez-Campos *et al.*, 2012a).

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

Remerciements

Nous remercions les laboratoires vétérinaires départementaux du réseau tuberculose ainsi qu'Alexandre Fediaevsky (DGAL) sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Références bibliographiques

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.

Courcou, A., Moutou, F., Vialard, J., 2013. Tuberculose bovine: investigations épidémiologiques au sein de troupeaux bovins infectés à plusieurs reprises. *Bull Epid Santé Anim Alim* 56, 10-14.

Dommergues, L., Rautureau, S., Petit, E., Dufour, B., 2012. Network of contacts between cattle herds in a French area affected by bovine tuberculosis in 2010. *Transbound Emerg Dis* 59, 292-302.

Fediaevsky, A., Courcou, A., Boschioli, M.L., Reveillaud, E., 2013. Tuberculose bovine en France en 2012 : des signaux favorables mais une situation toujours complexe dans certaines zones. *Bull Epid Santé Anim Alim* 59, 4-10.

Hars, J., Richomme, C., Rivière, J., Faure, E., Boschioli, M.L., 2012. Dix années de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage française et perspectives. *Bull Epid Santé Anim Alim* 52, 2-6.

Hauer, A., De Cruz, K., Cochard, T., Godreuil, S., Karoui, C., Henault, S., Bulach, T., Banuls, A.L., Biet, F., Boschioli, M., 2015. Genetic Evolution of *Mycobacterium Bovis* Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978. *PLoS one* 10, e0117103.

Keck, N., Tiffay M.C., Desvaux, S., Smyej, F., Boschioli, M.L., Durand, B., Vogler, V., 2012. Bilan du dépistage généralisé de la tuberculose bovine par le test interféron- γ en Camargue. *Point Vét* 329, 66-70.

Rivière, J., Réveillaud, E., Boschioli M. L., Hars, J., Richomme, C., Faure, E., Hendrikx, P., Fediaevsky, A., 2013. Sylvatub: bilan d'une première année de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage en France. *Bull Epid Santé Anim Alim* 57, 10-15.

Rodriguez-Campos, S., Gonzalez, S., de Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Casal, C., Alvarez, J., Fernandez-de-Mera, I.G., Castellanos, E., Mateos, A., Saez-Llorente, J.L., Dominguez, L., Aranaz, A., 2012a. A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis. *Infect Genet Evol* 12, 877-882.

Rodriguez-Campos, S., Schurch, A.C., Dale, J., Lohan, A.J., Cunha, M.V., Botelho, A., De Cruz, K., Boschioli, M.L., Boniotti, M.B., Pacciarini, M., Garcia-Pelayo, M.C., Romero, B., de Juan, L., Dominguez, L., Gordon, S.V., van Soolingen, D., Loftus, B., Berg, S., Hewinson, R.G., Aranaz, A., Smith, N.H., 2012b. European 2--a clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infect Genet Evol* 12, 866-872.

Smith, N.H., Berg, S., Dale, J., Allen, A., Rodriguez, S., Romero, B., Matos, F., Ghebremichael, S., Karoui, C., Donati, C., Machado Ada, C., Mucavele, C., Kazwala, R.R., Hilty, M., Cadmus, S., Ngandolo, B.N., Habtamu, M., Oloya, J., Muller, A., Milian-Suazo, F., Andrievskaia, O., Projahn, M., Barandiaran, S., Macias, A., Muller, B., Zanini, M.S., Ikuta, C.Y., Rodriguez, C.A., Pinheiro, S.R., Figueroa, A., Cho, S.N., Mosavari, N., Chuang, P.C., Jou, R., Zinsstag, J., van Soolingen, D., Costello, E., Aseffa, A., Proano-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., Zarraga, A.M., Buller, N., Skuce, R., Michel, A., Aranaz, A., Gordon, S.V., Jeon, B.Y., Kallenius, G., Niemann, S., Boniotti, M.B., van Helden, P.D., Harris, B., Zumarraga, M.J., Kremer, K., 2011. European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect Genet Evol* 11, 1340-1351.