

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun – Tiaret



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Sciences de la Nature et de la Vie

THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES

Présentée et soutenue publiquement

Contribution à l'étude de la tuberculose bovine dans quelques régions d'Algérie :

Approche lésionnelle et moléculaire.

Par **Fatah TAZERART**

Devant le Jury composé de :

MIHOUB F.	Professeur, Univ. Ibn Khaldoun, Tiaret	Président
GUETARNI D.	Professeur, Univ. Saad Dahleb, Blida	Examineur
BOUSMAHA F.	Maitre de conférences A, Univ. Ibn Khaldoun, Tiaret	Examineur
BADIS A.	Professeur, Univ. Saad Dahleb, Blida	Examineur
NIAR A.	Professeur, Univ. Ibn Khaldoun, Tiaret	Promoteur
SAHRAOUI N.	Professeur, Univ. Saad Dahleb, Blida	Co-promotrice
DRANCOURT M.	Professeur, Univ. Aix-Marseille, IHU Méditerranée Infection, Marseille	Co-promoteur

Tiaret, décembre 2021

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun – Tiaret



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Sciences de la Nature et de la Vie

THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES

Présentée et soutenue publiquement

Contribution à l'étude de la tuberculose bovine dans quelques régions d'Algérie : Approche lésionnelle et moléculaire.

Par **Fatah TAZERART**

Devant le Jury composé de :

MIHOUB F.	Professeur, Univ. Ibn Khaldoun, Tiaret	Président
GUETARNI D.	Professeur, Univ. Saad Dahleb, Blida	Examineur
BOUSMAHA F.	Maitre de conférences A, Univ. Ibn Khaldoun, Tiaret	Examineur
BADIS A.	Professeur, Univ. Saad Dahleb, Blida	Examineur
NIAR A.	Professeur, Univ. Ibn Khaldoun, Tiaret	Promoteur
SAHRAOUI N.	Professeur, Univ. Saad Dahleb, Blida	Co-promotrice
DRANCOURT M.	Professeur, Univ. Aix-Marseille, IHU Méditerranée Infection, Marseille	Co-promoteur

Tiaret, décembre 2021

Résumé général

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), une espèce du complexe *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose animale et humaine. En Algérie cependant, la structure de la population de *M. bovis* est inconnue, ce qui limite la compréhension des sources et de la transmission de la tuberculose bovine. Aussi, l'épidémiologie moléculaire du complexe *Mycobacterium tuberculosis* circulant chez l'homme en Algérie est mal décrite.

Enquête 1 : Une enquête rétrospective a été réalisée dans cinq abattoirs en Algérie entre 2010 et 2015. Une prévalence de 5,44% (6345/116619) des carcasses inspectées présentaient des lésions suspectes de tuberculose et ces lésions sont principalement localisées dans la cage thoracique (poumons et ganglions lymphatiques pulmonaires) (n = 6272 ; 70,34 %).

Enquête 2 : Dans cette étude et dans cinq abattoirs du pays, nous avons identifié la séquence complète du génome (WGS) de 13 souches de *M. bovis* isolées de bovins présentant des lésions compatibles avec la tuberculose. Nous avons constaté que sur ces 13 *M. bovis*, six isolats étaient regroupés avec des souches cliniques de référence de *M. bovis* de génotype inconnu², trois isolats appartenaient au génotype *M. bovis*-Europe 2 et il y avait un nouveau clone pour deux isolats de *M. bovis*.

Enquête 3 : Chez l'homme, nous avons analysé 98 isolats collectés en 2015-2018 dans cinq S.C.T.M.R. du pays. Le séquençage du polymorphisme à grande séquence de quelques régions génomiques a révélé la prédominance de la lignée 4 de *M. tuberculosis* (Euro-américaine) (n=93/98) et un seul isolat d'un liquide bronchique a été identifié comme étant la lignée 2 de *M. tuberculosis* (Beijing). Quatre isolats responsables de tuberculose pulmonaire ont été identifiés comme *Mycobacterium bovis* ont été confirmés par séquençage du génome entier.

Au terme de ces travaux nous avons rapporté les preuves de l'existence de *M. bovis* comme agent causal de la tuberculose bovine en Algérie où l'épidémiologie de cette maladie chez les bovins est en partie déterminée par les mouvements transfrontaliers d'animaux. Aussi, avec notre approche basée sur le séquençage du génome entier, nous rapportons pour la première fois la preuve de l'existence de *M. bovis* comme cause de tuberculose humaine en Algérie.

Mots clés : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, tuberculose, tuberculose bovine, séquençage du génome entier Algérie.

General abstract

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), a *Mycobacterium tuberculosis* complex species responsible for animal and human tuberculosis. In Algeria however, the *M. bovis* population structure is unknown, limiting understanding of the sources and transmission of bovine tuberculosis. In addition, the molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex circulating in humans in Algeria is poorly described.

Survey 1: A retrospective survey was carried out in five slaughterhouses in Algeria between 2010 and 2015. A prevalence of 5.44% (6345/116619) of the carcasses inspected showed suspicious lesions of tuberculosis and these lesions were mostly localized in the thoracic cage (lungs and pulmonary lymph nodes) (n = 6272; 70.34%).

Survey 2: In this study and in five slaughterhouses in the country, we identified the whole genome sequence (WGS) of 13 *M. bovis* strains isolated from cattle exhibiting lesions compatible with tuberculosis. We found that of these 13 *M. bovis*, six isolates were grouped together with reference clinical strains of *M. bovis* genotype-Unknown2, three isolates belonged to *M. bovis* genotype-Europe 2 and there was one new clone for two *M. bovis* isolates.

Survey 3: In humans, we analyzed a 98-isolate collection gathered in 2015-2018 in five T.R.D.C.S. from the country. Large sequence polymorphism sequencing of a few genomic regions revealed the predominance of *M. tuberculosis* lineage 4 (Euro-American) (n=93/98) and only one isolate from a bronchial fluid was identified as *M. tuberculosis* lineage 2 (Beijing). Four isolates responsible for pulmonary tuberculosis and identified as *Mycobacterium bovis* were confirmed by whole-genome sequencing.

At the end of those investigations, we reported evidence of the existence of *M. bovis* as the causative agent of bovine tuberculosis in Algeria where epidemiology of this disease in cattle is partly driven by the cross-border movement of animals. Also, with our approach based on whole-genome sequencing, we report for the first time the evidence of the existence of *M. bovis* as a cause of human tuberculosis in Algeria.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, tuberculosis, bovine tuberculosis, whole genome sequencing, Algeria.

الملخص العام

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) ، نوع من المعقد ميكوبكتريوم السلوية المسؤولة عن مرض السل الحيواني والبشري. ومع ذلك، في الجزائر، فإن تركيب التجمّعات *Mycobacterium bovis* غير معروف، مما يحد من فهم مصادر وانتقال مرض السل البقري. كما أن وصف الوباء الجزيئي لمعقد ميكوبكتريوم السلوية المنتشرة في البشر في الجزائر موصوفة بشكل سيئ. **تحقيق 1:** تم إجراء تحقيق بأثر رجعي في خمسة مسالخ في الجزائر بين عامي 2010 و 2015. أظهرت النتائج أنه من بين 116.619 جثة بقري تم فحصها، كان 6345 جثة (5.44%) بها آفات مشتبه بإصابتها بمرض السل وتتركز هذه الآفات بشكل رئيسي في القفص الصدري (الرئتين والعقد الليمفاوية الرئوية) (العدد = 6272؛ 70.34%).

تحقيق 2: في هذه الدراسة وفي خمسة مسالخ في الجزائر، حددنا التسلسل الجينوم الكامل (WGS) لـ 13 سلالة من *M. bovis* معزولة من الحيوانات المصابة بآفات متوافقة مع مرض السل. وجدنا أنه من بين هذه الـ 13 *M. bovis*، ست عزلات متجمعة مع سلالات مرجعية سريرية من *M. bovis* النمط الجيني غير المعروف 2، وثلاث عزلات تنتمي إلى النمط الجيني *M. bovis*-Europe 2، وكان هناك استنساخ واحد جديد لعزلتين من *M. bovis*.

تحقيق 3: عند البشر، قمنا بتحليل 98 عزلة تم جمعها في 2015-2018 في خمسة خمس مؤسسات تابعة لمصلحة مكافحة السل وأمراض الجهاز التنفسي في خمس مناطق جزائرية. كشف تسلسل تعدد الأشكال ذو التسلسل الكبير لبعض المناطق الجينومية عن هيمنة *M. tuberculosis* النسب 4 (الأوروبية الأمريكية) (ن = 98/93) وتم تحديد عزلة واحدة من سائل القصبة الهوائية على أنها النسب 2 من *M. tuberculosis* (بكين). تم التعرف على أربع عزلات مسؤولة عن مرض السل الرئوي على أنها *Mycobacterium bovis* وتم تأكيدها من خلال تسلسل الجينوم الكامل.

في نهاية هذا العمل، أبلغنا عن دليل على وجود *M. bovis* كعامل مسبب لمرض السل البقري في الجزائر حيث يتم تحديد وبائيات هذا المرض في الماشية جزئياً من خلال تحركات الحيوانات عبر الحدود. من خلال نهجنا القائم على تسلسل الجينوم الكامل، نقدم تقريراً لأول مرة عن الدليل على وجود *M. bovis* كسبب لمرض السل البشري في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: ميكوبكتريوم السلوية ، *Mycobacterium bovis* ، السل ، السل البقري ، تسلسل الجينوم الكامل، الجزائر.

Agzul amatu

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), d cctla n ucuran *Mycobacterium tuberculosis* i ixeddmen lberd n yimdanen d yiwersiwen. I Lezzayer, tiski n ugraw n *M. bovis* ur tettwassen ara, d ayen i yeğġan ur negzi ara akken iwata sebba n usençeđ n lberd n yiwersiwen. Dayen, tussna n waṭṭan n uqeclaw n ucuran *Mycobacterium tuberculosis* i ilehḥun yer umdan di Lezzayer ur jerdn ara fell-as akken ilaq.

Tasestant 1 : tasestant tettwaxdem deg semmus n imezla di Lezzayer gar 2010 d 2015. Tajrut n 5,44% (6345/116619) n imeslax sfeqden beggnen-d inegzumen yettaken anzi i wid n lberd, inegzumen-agi llan ugar deg idmaren (turin akked iwelsan n llamf) (n = 6272 ; 70,34 %).

Tasestant 1 : Deg tezrawt-agi d semmus imezla deg tmurt, nufa-d agzum n ujinum (WGS) n 13 n igerrumen n *M. bovis* i d-yettwaksen deg izgaren yesean igzumen yettaken anzi i lberd. Nufa-d d akken gar 13 *M. bovis*, ṣa n tukkisin ddukulent akked igzumen n umnir *M. bovis* n ujinutip ur nettwassen², krađ n tukkisin tekkint ar ujinutip *M. bovis*-Europe 2 u tella cctla tamaynut i snat n tukkisin n *M. bovis*.

Tasestant 1 : yer umdan, nessefqed 98 n tukkisin i d-negmer gar 2015-2018 deg semmus n S.C.T.M.R. n tmurt. Tifin n upulimurf n kra imeđqan n ujinum ibeggen-d d akken teqqwa tarwa 4 n *M. tuberculosis* (Turupt-Marikan) (n=93/98) u yiwet n tukkist n waman n yidmaren tettwaεqal n tarwa 2 n *M. tuberculosis* (Beijing). Kuḥ n tukkisin i ixeddmen lberd n turin ttwaεqlent d *Mycobacterium bovis* ufant-ten-id s usegzem n ujinum irkel.

I taggara n wahil-agi newwi-d tamatart n tilin n *M. bovis* u d netta i d sebba n lberd n yiwersiwen di Lezzayer anda tussna n waṭṭan teqqen akked tikli gar tlisa n yiwersiwen d ifuras n yiwersiwen. Newwi-d dayen tamatart d akken *M. bovis* d netta i d sebba n lberd n yimdanen di Lezzayer.

Awalen uqqinen: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, lberd, lberd n yizgaren, asegzem n ujinum, Lezzayer.

Résumé 1 :

La tuberculose, causée par *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), est une maladie zoonotique, ré-émergente chez les animaux et les humains. Une enquête rétrospective a été réalisée dans cinq abattoirs en Algérie entre 2010 et 2015. Les résultats ont montré que sur 116619 carcasses de bovins inspectées, 6345 carcasses (5,44%) présentaient des lésions suspectes de tuberculose. La forte prévalence des cas suspects est enregistrée à l'abattoir de Médéa (14,87 %) et la plus faible a été enregistrée à l'abattoir de Mouzaia (2,38 %). Cette différence dans le nombre de bovins suspects enregistrés dans les différents abattoirs est significative ($p < 0,001$).

Les lésions de type tuberculeux sont principalement localisées dans le système respiratoire (poumons et ganglions lymphatiques pulmonaires) ($n = 6272$; 70,34 %) suivi du foie ($n = 1540$; 17,27 %) et de la tête ($n = 853$; 9,56 %). Pendant la période de l'étude, un poids de 69731 kg de viande a été saisi.

L'incidence des cas de tuberculose augmente significativement ($p < 0,001$) entre 2010 et 2015. L'incidence minimale est observée en 2010 (4,01 %) et l'incidence maximale (7,72 %) est enregistrée en 2015. Les résultats ont également montré que l'incidence mensuelle minimale est enregistrée pendant la période estivale, avec 4,78 % et 4,73 % en juillet et août, respectivement. Néanmoins, la saison n'a pas d'effet significatif ($p = 0,88$) sur le pourcentage de cas de tuberculose. Aussi, la différence dans le nombre de cas de tuberculose enregistrés entre les mois de l'année n'est pas significative ($p = 0,69$).

Mots clés : tuberculose, *Mycobacterium bovis*, lésions, Algérie.

Résumé 2 :

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), une espèce du complexe *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose chez les bovins et de la tuberculose zoonotique chez l'homme, est présente en Algérie. En Algérie cependant, la structure de la population de *M. bovis* est inconnue, ce qui limite la compréhension des sources et de la transmission de la tuberculose bovine.

Dans cette étude, nous avons identifié la séquence complète du génome (WGS) de 13 souches de *M. bovis* isolées d'animaux présentant des lésions compatibles avec la tuberculose, qui ont été abattues et inspectées dans cinq abattoirs en Algérie. Nous avons constaté que six isolats étaient regroupés avec des souches cliniques de référence de *M. bovis* de génotype inconnu2. Un isolat était apparenté au génotype *M. bovis*-Inconnu7, un isolat était apparenté au génotype *M. bovis*-Inconnu4, trois isolats appartenaient au génotype *M. bovis*-Europe 2 et il y avait un nouveau clone pour deux isolats de *M. bovis*. Deux isolats de Blida n'ont présenté aucune différence par paire dans les polymorphismes d'un seul nucléotide. Aucun de ces 13 isolats n'était étroitement lié aux quatre isolats zoonotiques de *M. bovis* que nous avons précédemment caractérisés en Algérie (troisième enquête).

En Algérie, l'épidémiologie de la tuberculose bovine chez les bovins est en partie déterminée par les mouvements transfrontaliers d'animaux et de produits animaux.

Mots clés: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, tuberculose bovine, Algérie.

Résumé 3 :

L'épidémiologie moléculaire du complexe *Mycobacterium tuberculosis* est mal décrite en Algérie.

Nous avons analysé 98 isolats collectés en 2015-2018 dans cinq établissements du Service de lutte contre la tuberculose et les maladies respiratoires dans cinq régions algériennes pour identifier l'espèce causale du complexe *M. tuberculosis* et les lignées de *M. tuberculosis* circulant en Algérie. Les isolats ont tous été confirmés comme étant des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* par séquençage D exact à répétition en tandem.

Un autre séquençage du polymorphisme à grande séquence des régions génomiques RD105, RD239 et RD750 et du gène de la polykétide synthase pks15/1 a révélé la prédominance de la lignée 4 de *M. tuberculosis* (Euro-américaine) (n=93/98), dont 79/93 cas de tuberculose pulmonaires et 14/93 cas de tuberculose extrapulmonaire dans les cinq régions, alors qu'un seul isolat d'un liquide bronchique a été identifié comme étant la lignée 2 de *M. tuberculosis* (Beijing).

Quatre isolats responsables de tuberculose pulmonaire et identifiés comme *Mycobacterium bovis* ont été confirmés par séquençage du génome entier dans deux régions algériennes, indiquant une réémergence après une éclipse de 10 ans.

Mots clés : Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, séquençage du génome entier, Algérie.

Abstracts

Abstract 1:

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), is a zoonotic disease, re-emerging in animals and humans. A retrospective survey was carried out in five slaughterhouses in Algeria between 2010 and 2015. Results showed that out of 116,619 cattle carcasses inspected, 6,345 carcasses (5.44%) had suspicious lesions of tuberculosis. The high prevalence of suspected cases is recorded at the Médéa slaughterhouse (14.87%) and the lowest was registered at the abattoir of Mouzaia (2.38%). This difference in the number of suspect cattle recorded in the different slaughterhouses was significant ($p < 0.001$). Tuberculosis-like lesions were mostly localized in the respiratory system (lungs and pulmonary lymph nodes) ($n = 6,272$, 70.34%) followed by the liver ($n = 1,540$, 17.27%) and the head ($n = 853$, 9.56%). During the period of the study, a weight of 69,731 kg of meat was seized. The incidence of tuberculosis cases does not stop increasing ($p < 0.001$) between 2010 and 2015. The minimum incidence is observed in 2010 (4.01%), and the maximum incidence (7.72%) is recorded during the year 2015. Results showed also that the minimum monthly incidence is recorded during the summer period, with 4.78% and 4.73% in July and August respectively. Nevertheless, the season has no significant effect ($p = 0.88$) on the percentage of tuberculosis cases. Also, the difference in the number of tuberculosis cases recorded between the months of the year is not significant ($p = 0.69$).

Keywords : Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, lesions, Algeria.

Abstract 2:

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), a *Mycobacterium tuberculosis* complex species responsible for tuberculosis in cattle and zoonotic tuberculosis in humans, is present in Algeria. In Algeria however, the *M. bovis* population structure is unknown, limiting understanding of the sources and transmission of bovine tuberculosis. In this study, we identified the whole genome sequence of 13 *M. bovis* strains isolated from animals exhibiting lesions compatible with tuberculosis, which were slaughtered and inspected in five slaughterhouses in Algeria. We found that six isolates were grouped together with reference clinical strains of *M. bovis* genotype-Unknown2. One isolate was related to *M. bovis* genotype-Unknown7, one isolate was related to *M. bovis* genotype-Unknown4, three isolates belonged to *M. bovis* genotype-Europe 2 and there was one new clone for two *M. bovis* isolates. Two isolates from Blida exhibited no pairwise differences in single nucleotide polymorphisms. None of these 13 isolates were closely related to four zoonotic *M. bovis* isolates previously characterized in Algeria. In Algeria, the epidemiology of bovine tuberculosis in cattle is partly driven by cross border movements of animals and animal products.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, tuberculosis cattle, Algeria.

Abstract 3:

Molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is poorly described in Algeria.

We analyzed a 98-isolate collection gathered in 2015-2018 in five Tuberculosis and Respiratory Disease Control Service facilities in five Algerian regions to identify the causative *M. tuberculosis* complex species and the *M. tuberculosis* lineages circulating in Algeria. Isolates were all confirmed as *M. tuberculosis* complex mycobacteria by exact tandem repeat D sequencing.

Further large sequence polymorphism sequencing of genomic regions RD105, RD239, and RD750 and of the polyketide synthase gene *pks15/1* revealed the predominance of *M. tuberculosis* lineage 4 (Euro-American) (n=93 /98), including 79/93 pulmonary tuberculosis cases and 14/93 extrapulmonary tuberculosis cases in the five regions, whereas only one isolate from a bronchial fluid was identified as *M. tuberculosis* lineage 2 (Beijing).

Four isolates responsible for pulmonary tuberculosis and identified as *Mycobacterium bovis* were confirmed by whole-genome sequencing in two Algerian regions, indicating reemergence after a 10-year eclipse.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, whole genome sequencing, Algeria.

ملخصات

ملخص 1

السل، الذي تسببه *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)، هو مرض حيواني المنشأ، يعود إلى الظهور في الحيوانات والبشر. تم إجراء تحقيق بأثر رجعي في خمسة مسالخ في الجزائر بين عامي 2010 و2015.

أظهرت النتائج أنه من بين 116.619 جثة بقرية تم فحصها، كان 6345 جثة (5.44%) بها آفات مشتبه بإصابتها بمرض السل.

تم تسجيل أعلى نسبة انتشار للحالات المشتبه بها في مسلخ المدينة (14.87%) وأدناها سجلت في مسلخ موزاية (2.38%).

هذا الاختلاف في عدد الأبقار المشبوهة المسجلة في المسالخ المختلفة معتبر ($P > 0.001$).

تتركز الآفات الشبيهة بالسل بشكل رئيسي في الجهاز التنفسي

(الرئتين والعقد الليمفاوية الرئوية) (ن = 6272؛ 70.34%) يليها

الكبد (ن = 1540؛ 17.27%) والرأس (ن = 853؛ 9.56%).

خلال فترة الدراسة، تم ضبط وزن 69.731 كجم من اللحوم.

ارتفع معدل حدوث حالات السل بشكل ملحوظ ($p > 0.001$) بين عامي 2010 و2015.

ارتفع معدل حدوث حالات السل بشكل ملحوظ ($p < 0.001$) بين عامي 2010

و2015. لوحظ الحد الأدنى من الإصابة في عام 2010 (4.01%) وتم تسجيل

الحد الأقصى (7.72%) في عام 2015.

كما أظهرت النتائج أن الحد الأدنى للوقوع الشهري خلال فترة الصيف

بلغ 4.78% و 4.73% في شهري يوليو وأغسطس على التوالي.

إلا أن الموسم لم يكن له تأثير معتبر ($p = 0.88$) على النسبة المئوية لحالات السل.

كما أن الاختلاف في عدد حالات السل المسجلة بين شهور السنة ليس

معتبرا ($p = 0,69$).

الكلمات المفتاحية: السل، *Mycobacterium bovis*، الآفات، الجزائر.

ملخص 2

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) ، نوع من المعقد ميكوبكتريوم السلوية المسؤولة عن مرض السل في الأبقار ومرض السل الحيواني المنشأ في البشر موجود في الجزائر.

ومع ذلك، في الجزائر، فإن تركيب التجمعات *Mycobacterium bovis* غير معروف ، مما يحد من فهم مصادر وانتقال مرض السل البقري.

في هذه الدراسة، حددنا تسلسل الجينوم الكامل (WGS) لـ 13 سلالة من *Mycobacterium bovis* معزولة من الحيوانات المصابة بآفات متوافقة مع مرض السل، والتي تم ذبحها وتفتيشها في خمسة مسالخ في الجزائر. وجدنا أنه تم تجميع ستة عزلات مع سلالات مرجعية سريرية من *Mycobacterium bovis* من النمط الوراثي غير المعروف 2 (M. bovis-Unknown2). ارتبطت عزلة واحدة بالنمط الجيني M. bovis-Unknown7، بينما كانت عزلة واحدة مرتبطة بالنمط الجيني M. bovis-Unknown4، كانت ثلاث عزلات من M. bovis-Europe 2 وكان هناك استنساخ جديد لعزلتين من *Mycobacterium bovis*. أظهرت عزلتان من البلدية عدم وجود فرق زوجي في تعدد أشكال النوكليوتيدات المفردة.

لم تكن أي من هذه العزلات الـ 13 مرتبطة ارتباطًا وثيقًا بأربعة عزلات حيوانية المصدر من *Mycobacterium bovis* التي تم تمييزها سابقًا في الجزائر.

في الجزائر، يتم تحديد وبائيات مرض السل البقري في الماشية جزئيًا من خلال تحركات الحيوانات والمنتجات الحيوانية عبر الحدود.

الكلمات المفتاحية: ميكوبكتريوم السلوية، *Mycobacterium bovis*، السل البقري، الجزائر.

ملخص 3

وصف الوباء الجزيئي لمعقد ميكوبكتريوم السلية سيء في الجزائر.

قمنا بتحليل 98 عزلة تم جمعها في 2015-2018 في خمس مؤسسات تابعة لمصلحة مكافحة السل وأمراض الجهاز التنفسي في خمس مناطق جزائرية لتحديد الأنواع المسببة من المعقد *M. tuberculosis* و الأنساب *M. tuberculosis* المنتشرة في الجزائر.

تم التأكد من أن جميع العزلات عبارة عن بكتيريا المعقد *M. tuberculosis* بواسطة التسلسل المتكرر الترادفي D الدقيق.

كشف التسلسل الإضافي لتعدد الأشكال المتسلسل الكبير للمناطق الجينومية RD105 و RD239 و RD750 وجين بوليكتيد سينسيز 1 / pks15 هيمنة *M. tuberculosis* النسب 4 (الأوروبية الأمريكية) (ن = 98/93)، بما في ذلك 79 / 93 حالة من مرض السل الرئوي و 14/93 حالة من السل خارج الرئة في المناطق الخمس، بينما تم تحديد عزلة واحدة فقط من السائل القصي على أنها النسب 2 من *M. tuberculosis* (بكين).

أربع عزلات مسنولة عن مرض السل الرئوي والتي تم تحديدها على أنها *Mycobacterium bovis* تم تأكيدها من خلال تسلسل الجينوم الكامل في منطقتين جزائريتين، مما يشير إلى عودة الظهور بعد كسوف 10 سنوات.

الكلمات المفتاحية: السل، *Mycobacterium tuberculosis*، *Mycobacterium bovis*، تسلسل الجينوم الكامل، الجزائر

Igzulen

Agzul 1 :

Lberd, txeddem-it-id *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), d aţţan yettentāden deg uyersiw yer umdan, yuḡal yeqqwa yer yimdanen d yiwersiwen. Tasestant tettwaxdem deg semmus n isezlayen di Lezzayer gar 2010 d 2015. Igemmuḍen begnen-d d akken seg 116619 n yiwersiwen yemmezlen, 6345 n tyessiwin sēan-t aters am widak n lberd. Tajrut meqqren anda i ten-id-ufan d asezlay n Mdeyya (14,87 %), tajrut tameçtuḥt tella deg usezlay n Muzzāya (2,38 %). Amgired n umḍan n yizgaren i cukken sēan lberd deg usezlay yer wayeḍ tesēa azal ($p < 0,001$).

Aters am wid n lberd llan ugar deg igman n usnuffes (turin, iwelsan n llamf n turin) ($n = 6272$; 70,34 %) teḍfer-it-id tasa ($n = 1540$; 17,27 %) akked uqerruy ($n = 853$; 9,56 %). Deg wakud n tezrawt, azal n 69731 kg n weksun i yettwaḍegren.

Tajrut n lberd trennu s wazal ($p < 0,001$) gar 2010 d 2015. Tajrut tameçtuḥt tella deg 2010 (4,01 %) akked tejrut tameqqrant (7,72 %) jerden-tt deg 2015. Igemmuḍen begnen-d dayen d akken tajrut tameçtuḥt deg wayyur tettujerred deg unebdu, c 4,78 % d 4,73 % deg yulyu d yuct, s uḍfar. Xas akka, tasemhuyt ur tesēi ara aţas azal ($p = 0,88$) yef uktamur n tejrutin n lberd. Dayen, amgired deg umḍan n tejrutin n lberd yettwajerden deg ayyur yer wayeḍ ur tesēi ara azal ($p = 0,69$).

Awalen uqqinen: Lberd, *Mycobacterium bovis*, aters, Lezzayer.

Agzul 2 :

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), d cçetla n ucuran *Mycobacterium tuberculosis* i ixedmen lberd yer yizgaren akked lberd yettençađen i wemdan, tella di Lezzayer. Di Lezzayer, tamsukt n uhdum n *M. bovis* ur tettwassen ara, d ayen yeğğan ur negzi ara akken iwata ssebba n unçađ n lberd n yizgaren.

Di tezrawt-agi, nukex-d agzum n ujinum (WGS) n 13 n igerrumen n *M. bovis* i d-yettwakksen deg iyersiwen yesēan aters yettaken anzi yer lberd, i yettwamezlen u sfeqden-ten imejjayen n yiyersiwen deg semmus n isezlayan di Lezzayer. Nerra-d lewhi d akken sđis n tukkisin myagen-t akked temsuktin n tmesluyt *M. bovis* n ujinutip wis sin ur nettwassen ara. Yiwet n tukkist tettak anzi ar ujinutip *M. bovis*-ur-nettwassen⁷, tukkist tettemcabi ar ujinutip *M. bovis*-ur-nettwassen⁴, krađ n tukkisin tekkin-t ar ujinutip *M. bovis*-tuřupt 2 u llant snat n tukkisin timaynutin n *M. bovis* . Snat n tukkisin deg Blida ur d-begnent ara amgired seg tyuga deg upulimurfizm n yiwen n unikliyutid. Ula d yiwen seg 13 n tukkisin timaynutin yettak anzi i kuř n *M. bovis* yellan yakan deg Lezzayer.

Di Lezzayer, tussna n wařřan n lberd n yizgaren yer yizgaren yeqqen yer tikli gar tliisa d ifuras n yiyersiwen.

Awalen uqqinen: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, lberd n yizgaren, Lezzayer.

Agzul 3:

Tussna n waṭṭan n cubar n ucuran *Mycobacterium tuberculosis* ur xdimen fell-as tizrawin akken iwata.

Nesleḍ 98 n tukkisin i d-nejmeɛ deg 2015-5018 deg semmus n tnebdalin i ixedmen mgal aṭṭan n lberd d waṭṭanen n turin deg semmus n temnaḍin n Lezzayer iwakken ad d-naf ccetla ixedmen aṭṭan deg ucuran *M. tuberculosis* akked igerrumen n *M. tuberculosis* i ileḥḥun di Lezzayer. Tukkin bagnet-d d tid ittekin yer mikubaktiri n ucuran *M. tuberculosis* s ulkam D n tidet s uɛiwed.

Alkam nniḍen n upulimurfizm n ugzum n temnaḍin n ujinum RD105, RD239 d RD750 akked jen n upulikitid sintaz pks15/1 seknent-d d akken agerrum wis 4 n *M. tuberculosis* (Turupt-Marikan)d win i yeqqwan (n=93/98), gar-aset 79/93 n lberd n turin d 14/93 n lberd beṛa n turin deg semmus n temnaḍin agi, xas akka, siwa yiwet n tukkist i d-ufan deg waman n turin i ittekin yer ugerrum 2 n *M. tuberculosis* (Beijing).

Ukuḥ n tukkisin n lberd n turin u banent d tid n *Mycobacterium bovis* ttubegnet-d s ulkam n ujinum irkel deg snat n temnaḍin di Lezzayer, anda tella tuḡalin n waṭṭan seld 10 iseggasen n ufsax.

Awalen uqqinen: lberd, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, alkam n ujinum irkel, Lezzayer

REMERCIEMENTS

Au nom de Dieu clément et miséricordieux qui par sa grâce j'ai pu achever ce travail. Je remercie Dieu, premièrement et éternellement, de m'avoir tout donné pour réaliser et mener ce travail. HamdoAllah.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à Moi-même. Je veux me remercier de croire en moi. Je tiens à me remercier pour tout le dur travail notamment le travail en laboratoire. Je me remercie moi-même de n'avoir pas désespéré dans les moments difficiles. Je me remercie de n'avoir jamais renoncé. Je me remercie de me relever et d'aller de l'avant. Bravo Fatah, je suis fier de toi.

Je tiens à remercier ;

Pr Niar Abdellatif, Professeur à l'université Ibn Khaldoun de Tiaret d'avoir supervisé ce travail, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils avisés tout au long de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Pr Sahraoui Naima, Professeure à l'université de Blida pour sa gentillesse, ses conseils avisés tout au long de ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Pr Drancourt Michel, Professeur à l'université Aix-Marseille et IHU Méditerranée Infection, Marseille pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils avisés tout au long de ce travail. Je le remercie également de m'avoir bien accueilli à l'IHU de Marseille, où tous les moyens du monde ont été mis à ma disposition pour une meilleure réalisation de ce travail et d'autres travaux. J'ai beaucoup appris de vous Professeur, Tanmirt-ik Mas.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame la Professeure MIHOUB Fatma, de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret, qui a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.

J'adresse mes vifs remerciements à monsieur le Professeur Guetarni Djamel, de l'université de Saad Dahleb, Blida1, qui nous a fait l'honneur de bien vouloir apporter ses compétences à notre jury.

Je remercie Docteur Bousmaha Fatma. Maître de conférences (A) de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret, qui nous a fait l'immense plaisir et l'honneur d'accepter de participer à notre jury.

Je remercie également Professeur Badis Abdelmalek, de l'université de Saad Dahleb, Blida1 qu'il trouve ici l'expression de nos sincères remerciements pour l'honneur qu'il nous fait de siéger à notre jury.

Je tiens à remercier Professeur Yala Djamel de m'avoir accueilli pour un stage au service de la tuberculose et les mycobactéries à l'Institut Pasteur.

J'adresse également mes vifs remerciements au Professeur Raoult Didier, directeur de l'IHU de Marseille, de m'avoir accepté dans son labo et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens du monde pour la bonne réalisation de mes travaux.

Mes sincères remerciements au personnel des cinq abattoirs visés par mon étude ; mes collègues les docteurs vétérinaires inspecteurs, les techniciens, les égorgeurs et les responsables. Je remercie particulièrement Azzedine Adrar de l'abattoir de Bgayet, pour son aide et ses orientations.

A mes chers (es) collègues qui m'ont aidé et contribué à la réalisation de ce travail ; Zolikha Ali Mahine, Wahiba Akkouche, Yanis Dissi, Amir Affoune, Fatima Aissaoui, Kenza Medini et Abderrahmane Benkouar, pour leur participation et la collecte d'échantillons. Merci docteurs.

Je remercie également le personnel des cinq SCTMR ; Mme Graba L., Mr Lamri Zahir, Mr Cherair Ali, Mr Kerrouche Moussa et le responsable du SCTMR de Tizi Ouzou pour leur aide précieuse et leur contribution à la réalisation de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Moula Nassim de l'université de Liège, pour son aide et ses conseils.

Je tiens également à remercier mes amis de l'IHU qui m'ont aidé dans mes travaux ; Gilles, Thierry, Emilie. Hanane, Ludivine, Meriem, Hacene, Claudia, Simon, Sihem, Luc, Carine, Muriel, Sophie et Wafaa. The Drancourt team ; Jamal, Ahmed, Amar, Ghiles, Zélika, Kenza, Elisabeth, Yasmine, Hamadou, Odilon, Anselme, Sofiane, Anh, Riccardo, Rémi, Madjid, Cheick, Rachid, Kenza et Katia.

Je tiens à remercier aussi mon ami Anh pour son aide et pour les bons moments, Merci pote.

Mes sincères remerciements vont à mes trois amis et frères qui m'ont beaucoup aidé et soutenu durant mon séjour à Marseille ; Nassim, Mustapha et Koceil, Tanmirt-nwen.

Je remercie mes amis à l'université ; Asma, Kahina, Asma, Shahrazed, Souad, Salah, Bachir, Madjid et Hamza.

Je tiens à remercier Madame Saidj Dyhia pour ses conseils et ses encouragements, tanmirth-im a Massa.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et à témoigner ma profonde reconnaissance à mon bras droit Sofiane Tahrikt. Je le remercie pour sa disponibilité, son aide, ses conseils et surtout sa compagnie. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et ma gratitude éternelle. Je suis chanceux de t'avoir connu a gma.

Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce travail, tout d'abord, à ma patrie l'Algérie ; mon beau pays, et à tous les martyrs de la libération ; ceux d'hier et ceux d'aujourd'hui.

A tous ceux qui luttent et combattent pour une Algérie libre et meilleure.

Mes ancêtres, je vous honore ; je vis dans la dignité que vous m'avez enseignée.

A Mes très chers parents

Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité et pour tout ce que vous m'avez apporté, pour les valeurs que vous m'avez transmises. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.

Veillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.

« Vava », Mon exemple, tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête et sage. Je tiens à te remercier pour tout ce que tu m'as transmis et donné, tu m'as appris le sens du travail et de la responsabilité. Je tiens à honorer l'homme que tu es.

« Imma », Tu n'as cessé de m'encourager et de me soutenir durant toutes ces années d'études. Tu as œuvré pour ma réussite par ton assistance et ta présence dans ma vie, par tes sacrifices, tes précieux conseils, ton amour et ton soutien. Je te remercie pour tes prières.

A mes chers frères ; Malek, Farid et Amine ;

A mes chères sœurs ; Nadia, Fatima, Nouara, Karima et Yasmina ;

*A la mémoire de ma très chère sœur Sarah, partie trop tôt, avec qui j'ai partagé de merveilleux moments de notre enfance. Tu resteras toujours dans nos cœurs.
Akimi3fou Rebbi.*

A mes chères belles-sœurs ; Fahima, Rahima et Meriem ;

A mes chers beaux-frères ; Mohamed, Kamel, Abdelkader, Khoudir et Nassim ;

A mes adorables neveux et nièces.

A ma fiancée, Amina. Tu n'as cessé de m'encourager, de me soutenir et de m'aider, je remercie Dieu de t'avoir mis sur ma route afin que tu m'apportes la joie et le bonheur.

✂ Je dédie ce travail aux deux équipes du cœur ; « vert & noir » ; les crabes ; Mouloudia Olympique Bgayet «M.O.B » et « vert & jaune » ; les canaris ; Jeunesse Sportive de Kabylie «J.S.K». ✂

A tous les enseignants qui m'ont enseigné depuis mon enfance. En particulier, ma première enseignante de la première année primaire Madame Tadjine Nadia, vous trouvez ici, Madame, l'expression de ma profonde reconnaissance.

A toute l'équipe de la cafétéria ; Slimane, Walid, Halim et Chafae.

A la mémoire de mon neveu Anis « Nani » et ma nièce Aya, partis trop tôt. Vous resterez toujours dans nos cœurs et vous resterez gravés dans nos mémoires. Akoni3fou Rebbi.

A toute personne qui reste convaincue que l'effort sincère et honnête est la seule voie vers la réussite et la réalisation de Soi.

TABLE DES MATIERES

RESUMES	
REMERCIEMENTS	
DEDICACES	
TABLE DES MATIERES	
LISTES DES FIGURES, TABLEAUX et ABREVIATIONS	
<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	35

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES

<i>I-1. Taxonomie et classification</i>	39
<i>I-2. Caractères</i>	43
I-2.1. Caractères bactériologiques.....	43
I-2.2. Caractères morphologiques	44
I-2.3. Caractères cultureux	45
I-2.4. Caractères biochimiques.....	47
<i>I-3. Résistance et sensibilité</i>	49

CHAPITRE II : LA TUBERCULOSE BOVINE

<i>II-1. Définition</i>	53
<i>II-2. Historique</i>	53
<i>II-3. Répartition</i> :.....	54
<i>II-4. Sources de contagion</i>	55
<i>II-5. Modes de transmission</i>	56
<i>II-6. Voies de pénétration</i>	56
<i>II-7. Etiopathogénie, Symptômes et Lésions</i>	57
II-7-1. Etiologie	57
II-7-2. Pathogénie	57
a) Etape primaire (primo-infection)	57
b) Etape secondaire.....	59
c) Développement d'une immunité exclusivement cellulaire.....	60

II-7.3. Symptômes.....	60
II-7.4. Lésions.....	61
Il existe deux types de lésions ; macroscopiques et microscopiques.	61
II-7.4.1. Lésions macroscopiques.....	61
II-7.4.2. Lésions microscopiques :.....	62
<i>Chapitre III : DEPISTAGE, DIAGNOSTIC, TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE</i>	
<i>III- 1. Dépistage allergique</i>	64
III-1.1. La tuberculation	64
III-1.2. Méthodes de tuberculation	64
III-1.2. 1. Intradermotuberculation simple (I.D.S) :	64
III-1.2. 2. Intradermotuberculation comparative (I.D.C) :	64
<i>III-2. Diagnostic</i>	65
III-2.1. Diagnostic clinique	65
III-2.2. Diagnostic différentiel	65
III-2.3. Diagnostic nécropsique	65
III-2.4. Diagnostic au laboratoire :	67
III-2.4.1. Diagnostic bactériologique.....	67
III-2.4.2. Diagnostic moléculaire	69
III-2.4.3. Diagnostic histopathologique	70
<i>III-3. Traitement et prophylaxie</i>	70
PARTIE EXPERIMENTALE	
<i>CHAPITRE IV : Enquête 1: Etude rétrospective de la tuberculose bovine dans cinq abattoirs en Algérie (Centre et Est).</i>	
IV-1. INTRODUCTION.....	72
IV-2. Cadre de l'étude	73
IV-2.1. Lieu et période de l'étude.....	73
IV-2.2. Choix des abattoirs	74
IV-3. MATERIEL et METHODES	74

<i>Analyses statistiques</i>	75
<i>IV-4. RESULTATS</i>	76
<i>IV-4.1. La consommation de viande bovine</i>	76
<i>IV-4.2. Effectif abattu par abattoir</i>	77
<i>IV-4.3. Abattage des femelles</i>	78
<i>IV-4.4. Détermination de la prévalence des lésions macroscopiques suspectes de tuberculose bovine</i>	79
<i>IV-4.5. Distribution des lésions suspectes de tuberculeuses sur les organes</i>	79
<i>IV-4.6. Evolution de la tuberculose dans cinq abattoirs</i>	80
<i>IV-4.7. Effet de la saison sur la découverte de lésions</i>	81
<i>IV-5. DISCUSSION</i>	83
<i>CONCLUSION</i>	89
<i>CHAPITRE V : Enquête 2: Analyse de la séquence du génome entier des isolats de bovins de Mycobacterium bovis, centre Algérien</i>	91
<i>V-1. INTRODUCTION</i>	91
<i>V-2. Cadre de l'étude</i>	92
<i>V-2.1. Lieu et période de l'étude</i>	92
V-2.1.1. Abattoirs	92
✓ Choix des abattoirs	93
V-2.1.2. Laboratoires	93
<i>V-3. MATERIEL et METHODES</i>	93
V-3.1. Matériel.....	93
V-3.1.1. Au niveau des abattoirs	93
V-3.1.2. Au niveau du laboratoire.....	94
V-3.1.2.1. A l'institut Pasteur d'Algérie :.....	94
V-3.1.2.2. A l'Institut Hospitalier Universitaire, Méditerranée Infection de Marseille (France)	94
✓ Laboratoire de niveau de biosécurité 3 (NSB 3)	94
✓ Laboratoire de niveau de biosécurité 2 (NSB 2)	95
V-3.2. Méthodes	96

V-3.2.1. Au niveau des abattoirs :	96
V-3.2.1.1. Inspection <i>post-mortem</i>	96
V-3.2.1.2. Collecte et acheminement des prélèvements	96
V-3.2.2. Au niveau de laboratoire	97
V-3.2.2.1. A l'Institut Pasteur d'Algérie	97
V-3.2.2.2. A l'Institut Hospitalo-Universitaire de Marseille	101
Analyses statistiques	111
V-4. RESULTATS	112
V-4.1.1. Prévalence des lésions suspectes de la tuberculose bovine.....	112
V-4.1.2. <i>Les facteurs de variation</i>	113
V-4.1.2.1. <i>Répartition des animaux abattus en fonction des facteurs de variation</i>	113
• Sexe :	113
• Age :	114
• Etat d'embonpoint :	115
V-4.1.2.2. <i>Répartition des cas suspects en fonction des facteurs de variation</i>	115
• Sexe :	115
• Age :	116
• Etat d'embonpoint :	117
V-4.1.3. <i>Localisation des lésions</i>	117
V-4.2. <i>Résultats de laboratoire</i>	121
V-4.2.1. Culture bactérienne	121
V-4.2.2. Identification bactérienne	122
V-4.2.3. <i>Analyse de typage pan-génomique</i>	124
V-5. DISCUSSION.....	127
CONCLUSION	134
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	135
CHAPITRE VI : <i>Enquête 3: Génotypage des lignées de Mycobacterium tuberculosis circulant chez l'homme en Algérie (la région Centre).</i>	137

VI-1. INTRODUCTION.....	137
VI-2. Cadre de l'étude.....	138
VI-2.1. Lieu et période de l'étude.....	138
Laboratoire	139
VI-3. MATERIEL et METHODES	139
VI-3.1. Matériel.....	139
VI-3.1.1. Au niveau des SCTMR :	139
VI-3.1.2. Au niveau de laboratoire :	140
VI-3.2. Méthodes.....	140
VI-3.2.1. SCTMR :	140
Collecte et acheminement des prélèvements.....	140
VI-3.2.2. Laboratoire :	141
VI-3.2.2.1. Identification des isolats	141
VI-3.2.2.2. Génotypage des isolats de <i>M. tuberculosis</i>	142
VI-3.2.2.3. Analyses de la séquence du génome entier	144
Analyses statistiques	145
VI-4. RESULTATS	146
VI-4.1. Population étudiée.....	146
VI-4.2. Facteurs de variations.....	146
VI-4.3. Type de tuberculose et localisation des lésions	148
VI-4.4. Génotypage du complexe <i>M. tuberculosis</i>	149
VI-4.4.1. PCR-sequencing of the Exact Tandem Repeat D (ETR-D).....	149
VI-4.4.2. PCR- Séquençage du gène de la polykétide synthase <i>pks15/1</i> et RD (RD105, RD239 and RD750)	150
VI-4.4.3. Analyse du séquençage du génome entier	151
VI-4.5. Localisation des lignées.....	153
VI-4.6. Répartition géographique des lignées	154
VI-5. DISCUSSION.....	156

<i>CONCLUSION</i>	161
<i>RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES</i>	162
<i>CONCLUSION GENERALE</i>	163
Fiche de renseignements.....	164
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	166
Production scientifique.....	204

A. LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Bactéries <i>Mycobacterium tuberculosis</i> observées sous microscopie électronique à balayage colorisée	44
Figure 2 :	Représentation schématique de la paroi des mycobactéries	45
Figure 3 :	Colonies positives de <i>M. bovis</i>	46
Figure 4 :	Colonies positives de <i>M. tuberculosis</i>	46
Figure 5 :	Pathogénie et évolution de la tuberculose animale	59
Figure 6 :	Tuberculose dans la cage thoracique et la plèvre	61
Figure 7 :	Tuberculose de l'utérus (endomètre)	61
Figure 8 :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen	68
Figure 9 :	Localisation des cinq abattoirs	74
Figure 10 :	Effectifs mensuels de bovins abattus dans les cinq abattoirs, 2010-2015	76
Figure 11 :	Effectif de bovins abattus entre 2010 et 2015	77
Figure 12 :	Effectif de bovins abattus et suspects dans les cinq abattoirs, entre 2010 et 2015.	78
Figure 13 :	Localisation des lésions suspectes de tuberculose	80
Figure 14 :	Incidence des cas de tuberculose entre 2010 et 2015	81
Figure 15 :	Incidence mensuelle des lésions suspectes de tuberculose dans les cinq abattoirs, 2010-2015	82
Figure 16 :	Distribution des cinq abattoirs situés dans quatre départements du nord de l'Algérie.	92
Figure 17 :	Manipulation sous PSM dans un laboratoire NSB3	95
Figure 18 :	Décontamination de l'homogénéisât avec NaOH	98
Figure 19 :	Agitation de tube sur agitateur de Kahn	98
Figure 20 :	Centrifugation de la suspension	99
Figure 21 :	Ensemencement sur milieu de <i>Löwenstein-Jensen</i>	99
Figure 22 :	Tubes placés sur portoirs dans l'étuve	100
Figure 23 :	Lésions suspectes de tuberculose au niveau des ganglions	101
Figure 24 :	Inactivation des isolats (bain sec à 100 °C)	104
Figure 25 :	Appareil FastPrep	105
Figure 26 :	Extracteur EZ1	105
Figure 27 :	Un thermocycleur	107

Figure 28 :	La plaque en aspiration	108
Figure 29 :	La plaque en agitation	108
Figure 30 :	Plaque de Séphadex sur une plaque <i>MicroAmp N801-560</i>	109
Figure 31 :	Un séquenceur	110
Figure 32 :	Prévalence des cas suspects de lésions tuberculeuses dans les cinq abattoirs	113
Figure 33 :	Animaux abattus en fonction du sexe	113
Figure 34 :	Animaux abattus en fonction de l'âge	114
Figure 35 :	Animaux abattus en fonction de l'état d'embonpoint	115
Figure 36 :	Répartition des cas suspects de tuberculose en fonction de l'état d'embonpoint	117
Figure 37 :	Localisation des lésions suspectes de tuberculose sur les organes	118
Figure 38 :	Tuberculose au niveau du ganglion trachéo-branchique droit	120
Figure 39 :	Tuberculose au niveau pulmonaire	120
Figure 40 :	Lésion caséuse au niveau de nœud lymphatique parotidien	120
Figure 41 :	Lésion caséuse au niveau du parenchyme des poumons	120
Figure 42 :	Résultats de la culture bactérienne.	121
Figure 43 :	Culture positive sur Coletsos	122
Figure 44 :	Résultats du Blast (souche du complexe <i>M. tuberculosis</i>)	122
Figure 45 :	Répartition des souches de <i>M. bovis</i> sur les cinq abattoirs	123
Figure 46 :	Arbre phylogénétique de 105 séquences génomiques de <i>Mycobacterium bovis</i> basé sur 2881 positions variables extraites à l'aide de MTBseq. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site polymorphe. L'arbre a été généré à l'aide des outils en ligne PhyML 3.0	126
Figure 47 :	Distribution des cinq S.C.T.M.R. localisés dans cinq wilayas dans le nord Algérien	139
Figure 48 :	Colonies de tuberculose sur Löwenstein-Jensen	140

Figure 49 :	Identification des patients selon leur sexe	146
Figure 50 :	Identification des patients selon les classes d'âge	147
Figure 51 :	Colonies de tuberculose sur Middlebrook 7H10	149
Figure 52 :	Assemblage et analyse des séquences	149
Figure 53 :	Résultats du Blast (souche du complexe <i>M. tuberculosis</i>)	150
Figure 54 :	Délétion de 7-bp (position 152 à 158)	150
Figure 55 :	Délétion de 6-bp (position 159 à 164)	151
Figure 56 :	Absence de délétion	151
Figure 57 :	Présentation schématique de la démarche suivie pour l'identification des lignées de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> circulant en Algérie	152
Figure 58 :	Répartition des lignées du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> circulant en Algérie	153
Figure 59 :	Fréquence des cas à <i>M. bovis</i> dans les deux départements	155

B. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Les caractères de différenciation entre espèces du complexe <i>M. tuberculosis</i> et les M.N.T	49
Tableau 2 :	Nombre et prévalence des femelles abattues	78
Tableau 3 :	Nombre et prévalence des cas suspects de tuberculose bovine	79
Tableau 4 :	Répartition des lésions suspectes de tuberculose	80
Tableau 5 :	Proportion des cas suspects de lésions tuberculeuses dans les cinq abattoirs	112
Tableau 6 :	Répartition des cas suspects de tuberculose en fonction du sexe	116
Tableau 7 :	Répartition des cas suspects de tuberculose en fonction de l'âge	116
Tableau 8 :	Répartition de la localisation des lésions	118
Tableau 9 :	Répartition de la localisation des lésions dans quatre abattoirs	119
Tableau 10 :	Répartition de la localisation des lésions dans l'abattoir de Médéa	119
Tableau 11 :	Résultats de la culture bactérienne	121
Tableau 12 :	Résultat de PCR RpoB et Séquençage génome complet	123
Tableau 13 :	Répartition des souches de <i>M. bovis</i> sur les organes	124
Tableau 14 :	Les caractéristiques démographiques des cas de tuberculose étudiés	148
Tableau 15 :	Localisation des lésions	148
Tableau 16 :	Distributions de différentes lignées dans cinq départements d'Algérie	154

C. LISTE DES ABREVIATIONS

B.A.A.R	Bacille Acido-Alcool-Résistant
B.C.G	Bacille de CALMETTE et GUERIN
I.D.C	Intradermotuberculation comparative
I.D.S	Intradermotuberculation simple
<i>M.</i>	<i>Mycobactérium</i>
M.N.T	Mycobactérie(s) non tuberculeuse(s)
NaOH	Hydroxyde de sodium
PCR	Polymerase Chain Reaction.
pH	Potentiel hydrogène
PNB	Acide para nitrobenzoïque
S.C.T.M.R	Service de Contrôle de la Tuberculose et les Maladies Respiratoires
TCH	Hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique
UV	Ultras violets

INTRODUCTION GENERALE

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse, transmissible et d'allure chronique (Niṭu *et al.*, 2017 ; Bandeira *et al.*, 2020). Commune à l'homme et aux animaux (Refaya *et al.*, 2020), elle est causée par l'une des espèces bactériennes appartenant au « complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)» qui renferme notamment *M. tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) qui sont des principaux agents de la tuberculose humaine et du bétail (bovin), respectivement (y García *et al.*, 2020 ; Refaya *et al.*, 2020). *M. bovis* peut également infecter l'homme, chez lequel la maladie ne peut être distinguée cliniquement, pathologiquement et radiologiquement de la tuberculose à *M. tuberculosis* (Wedlock *et al.*, 2002; De la Rúa-Domenech, 2006a).

En Algérie, la tuberculose bovine est une maladie négligée, sa situation n'est pas bien connue. La suspicion est souvent faite aux abattoirs et elle doit être confirmée ou infirmée par le diagnostic de laboratoire. L'évolution de la maladie, la circulation des souches de *M. bovis* et leur répartition géographique sont mal connues.

Afin d'estimer la prévalence de la tuberculose chez les bovins en Algérie et son évolution et afin d'identifier les mycobactéries causant la tuberculose chez cette espèce et chez l'homme et de mieux comprendre la circulation des souches de *M. bovis* et leur répartition géographique dans notre pays, nous nous sommes intéressés à étudier *M. bovis* chez ces deux espèces.

Pour cette raison nous nous sommes intéressés à réaliser deux enquêtes épidémiologiques au niveau de quelques abattoirs des différentes régions de l'Algérie, à savoir une enquête rétrospective dans le but d'apporter une meilleure compréhension de la situation actuelle de la tuberculose bovine en Algérie, et une enquête prospective qui visait à déterminer la prévalence des cas suspects et des cas confirmés de tuberculose dans cinq abattoirs et à estimer la diversité génétique des souches de *M. bovis* actuellement en circulation dans le pays.

Aussi, chez l'homme, nous nous sommes intéressés à réaliser une enquête au sein de cinq S.C.T.M.R. et les objectifs étaient de distinguer les espèces mycobactériennes au sein du complexe *M. tuberculosis* et de définir les lignées de *M. tuberculosis* circulant en Algérie.

Nous exposerons dans cette partie les problématiques et les objectifs de chaque étude et un aperçu bibliographique. Puis dans une partie expérimentale, nous exposerons les conditions expérimentales, le matériel mis en œuvre et les méthodes suivies pour leur réalisation, ainsi que les résultats obtenus suivis de discussion pour chacune des trois études.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES

I-1. Taxonomie et classification

Dans l'ordre des *Actinomycetales*, les mycobactéries appartiennent au genre de *Mycobacterium* qui est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. Trois groupes sont distingués : mycobactéries pathogènes obligatoires (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*), mycobactéries pathogènes opportunistes et mycobactéries saprophytes (Rastogi et al., 2001). Au sein du genre *Mycobacterium*, on distingue deux complexes majeurs :

- le complexe « *M. avium intracellulaire* », incluant *M. avium* et *M. paratuberculosis* (Biet et al., 2005),
- le « complexe *M. tuberculosis* », comportant des espèces humaines comme *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. canetti* ou des rongeurs (*Mycobacterium microti*), tandis que d'autres espèces ont un large spectre d'hôtes (*Mycobacterium bovis*) (Brosch et al., 2002). Ce complexe comporte aussi *M. caprae*, *M. bovis* Bacille Calmette–Guérin (BCG), et *M. pinnipedii* (Cousins et al., 2003).

En bactériologie médicale, on distingue classiquement trois groupes de mycobactéries (Cattoir, 2004 ; Romero-Montoya et al., 2017):

- ✓ Les espèces du complexe *M. tuberculosis*, responsables de la tuberculose ;
- ✓ Les mycobactéries non tuberculeuses, responsables des autres mycobactérioses ;
- ✓ *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen, agent de la lèpre.

Le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) :

Les mycobactéries groupées dans le complexe *Mycobacterium tuberculosis* sont caractérisées par une similarité de 99.9% au niveau de nucléotide et des séquences du rRNA 16S identiques mais diffèrent largement en termes de leurs tropismes, phénotypes et pathogénicité de l'hôte. (Brosch et al., 2002).

les mycobactéries du C.M.T. ont des hôtes préférentiels, mais elles peuvent être transmises à d'autres espèces animales (et l'homme), qui peuvent jouer un rôle dans leur épidémiologie comme leur transmission et leur entretien (Bénet et al., 2014). Ce complexe inclut les espèces bactériennes suivantes :

***Mycobacterium bovis*:**

C'est l'agent principal de la tuberculose du bétail (Kubica et al., 2006), responsable de la tuberculose bovine (Bénet et al., 2014 ; Musoke et al., 2015) et des animaux domestiques

comme les ovins, les caprins, les chiens, les chats (Bénet *et al.*, 2014). *M. bovis* a déjà été isolé à partir du dromadaire (Chartier, 1991), de chameau (Kinne *et al.*, 2006) et d'autres animaux sauvages comme le sanglier, le blaireaux et le lion (Bénet *et al.*, 2014). Cette mycobactérie a un pouvoir pathogène occasionnel chez les Psittacidés et les oiseaux (Bénet *et al.*, 2014). *M. bovis* peut infecter l'homme (Amanfu, 2006).

Les bovins peuvent à la fois contaminer les carnivores et l'homme qui à leur tour peuvent les recontaminer (Bénet *et al.*, 2014).

Il existe deux sous-espèces de *M. bovis* ;

***M. bovis* B.C.G:**

Bacille atténué de Calmette-Guérin (BCG), vaccin utilisé pour la prévention de la tuberculose liée à *M. tuberculosis* a été dérivé du bacille tuberculeux virulent, *M. bovis* (Mahairas *et al.*, 1996). Le BCG a été découvert et appliqué comme vaccin contre la tuberculose pour la première fois en 1921 (Calmette *et al.*, 1926 in Qie *et al.*, 2009).

***M. bovis caprae*:**

C'est l'agent responsable de la tuberculose caprine mais aussi bovine et ovine (Sahraoui *et al.*, 2009 ; Diguimbaye, 2004). Aranaz et ses collaborateurs décrivent *M. tuberculosis subsp. caprae* en 1999 à partir des souches de mycobactéries isolées de chèvre (Aranaz *et al.*, 1999). Par la suite, Niemann et ses collaborateurs prouvèrent que les caractères biochimiques et génétiques de *M. tuberculosis subsp. caprae* sont plus voisins de ceux de *M. bovis*. Ils proposèrent alors cette sous espèce dans l'espèce *M. bovis* avec la nomenclature de *M. bovis subsp. caprae* (Niemann *et al.*, 2002a). Cette sous-espèce diffère de *M. bovis* par sa sensibilité à la pyrazinamide (Aranaz *et al.*, 1999; Niemann *et al.*, 2002a). *M. caprae* peut également infecter l'homme (Cvetnic *et al.*, 2007 ; Aimé *et al.*, 2012).

Cependant, les travaux de Durate et ses collaborateurs ont rapporté que sur un total de 293 échantillons tuberculeux isolés de bovins (n=258), de chèvres (n=8), du cerf rouge (n=21) et du sanglier (n=6), 283 ont été identifiés comme *M. bovis*, 10 ont été identifiés comme *M. caprae* dont (7) chez les chèvres, (2) de bovins et (1) de sanglier (Duarte *et al.*, 2008).

***Mycobacterium tuberculosis* :**

Agent principal de la tuberculose humaine (Rosenkrands *et al.*, 2000 ; Adam *et al.*, 2014), *M. tuberculosis* est parfois isolé d'animaux domestiques comme le bétail (Ameni *et al.*, 2013),

chien (Erwin *et al.*, 2004), chat (Snider, 1971 in Erwin *et al.*, 2004), ou sauvages comme les primates, les éléphants, les autres ongulés exotiques, les mammifères marins et les psittacidés (Montali *et al.*, 2001).

***Mycobacterium africanum* :**

Responsable de la tuberculose humaine en Afrique (Cousins *et al.*, 2003). Depuis sa première description en 1968 (Castets *et al.*, 1968 in Niemann *et al.*, 2004), *M. africanum* a été trouvé dans plusieurs régions d'Afrique, où il représente jusqu'à 60% des souches isolées de patients atteints de tuberculose pulmonaire (Niemann *et al.*, 2002b; Niobe-Eyangoh *et al.*, 2003; Schwander *et al.*, 1995; Viana-Niero *et al.*, 2001 in Niemann *et al.*, 2004).

***Mycobacterium canettii* :**

C'est un agent également responsable de la tuberculose humaine en Afrique (Miltgen *et al.*, 2002). La première souche de *M. canettii* a été isolée par Georges Canetti en 1969. Vu le nombre très petit nombre d'infections à "*M. canettii*" rapportées, aucune différence n'a été mise en évidence avec l'infection classique à *M. tuberculosis* (Fabre *et al.*, 2004). Néanmoins, quelques auteurs considèrent qu'une infection à "*M. canettii*" pourrait induire une pneumonie plus douce que la tuberculose classique (Lopez *et al.*, 2003; Miltgen *et al.*, 2002). La principale différence est que *M. canettii* ne semble pas être transmissible de personne à personne (Loukil *et al.*, 2019). Van Soolingen *et al.* proposent de la désigner comme une nouvelle (sous) espèce, "*Mycobacterium tuberculosis subsp. Canetti*" ou "*M. canetti*" (Van Soolingen *et al.*, 1997).

***Mycobacterium microti* :**

Un membre du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, il a été découvert la première fois chez les campagnols sauvages par Wells en 1937 à la frontière Écosse-Grande-Bretagne (Wells, 1937 in Manabe *et al.*, 2002). Cette bactérie est rarement isolée d'autres animaux, comme lama, chats, porcs, hyrax de roche, furet (Huitema et Jaartsveld, 1967, Pattyn *et al.*, 1970, Van Soolingen *et al.*, 1998). Des infections à *M. microti* ont été décrites chez des patients immunodéprimés (Van Soolingen *et al.*, 1998).

***Mycobacterium pinnipedii* :**

Il a été isolé pour la première fois des pinnipèdes (phoque, les otaries et les morses), mais il est également pathogène pour les cobayes, les lapins, le tapir du Brésil et probablement le bétail (Cousins et *al.*, 2003). Il peut exceptionnellement infecter l'homme (soigneur mammifères marins du zoo) (Kiers et *al.*, 2008).

***Dassie bacillus* :**

Une espèce peu fréquente du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, caractérisé comme étant le plus similaire à *M. microti*. *Dassie bacillus* est l'agent causal de la tuberculose chez le daman des rochers « dassie » (*Procavia capensis*). En revanche, il n'est pas pathogène pour lapins, cobayes et l'infection humaine par *Dassie bacillus* n'a jamais été décrite (Mostowy et *al.*, 2004).

Oryx bacillus

Il a été isolé à l'origine d'oryx arabe et de camélidés (Van Helden et *al.*, 2009). C'est une espèce récemment décrite du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et elle est étroitement liée aux *Dassie bacillus*, *Mycobacterium africanum* et *Mycobacterium microti* (Pittius et *al.*, 2012).

Les mycobactéries non tuberculeuses

L'habitat habituel de la majorité des mycobactéries est l'eau ou les endroits riches en eaux, comme les mousses, les eaux de surface, la boue et la terre lorsqu'elle est enrichie en matière organique par les fèces ou le compost (Collins et *al.*, 1984) et aussi dans les sols humides et sédiments (Falkinham et *al.*, 2004, Pickup et *al.*, 2005 in Lucas et *al.*, 2007). Elles sont environnementales et peuvent être isolées de l'eau de boisson, des systèmes de distribution d'eau chaude, des machines à glace, les piscines et des aquariums (Pedley et *al.*, 2004 in Lucas et *al.*, 2007). Elles sont également isolées parfois en grand nombre dans les écosystèmes aquatiques comme les étangs, lacs, rivières et marais (Falkinham, 2004 in Lucas et *al.*, 2007). La plupart des mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) pathogènes isolées de l'eau peuvent former des biofilms (Falkinham et *al.*, 2001).

Dans la classification de Runyon et à l'exception des mycobactéries tuberculeuses (du complexe *Mycobacterium tuberculosis*) et des membres de taxons incultivables, les mycobactéries ont été divisées en quatre groupes en fonction des taux de croissance et des

propriétés de pigmentation (Brown-Elliott, 2011 ; De Groote et Huitt, 2006 ; Magee et Ward, 1869 in Bergey's Manual, 2012). Les groupes I, II et III englobent les mycobactéries à croissance lente (MCL), qui prennent plus de sept jours pour la formation des colonies sur le milieu solide d'agar. Le groupe IV renferme des mycobactéries à croissance rapide (MCR) qui se développent dans les sept jours sur le même milieu (Brown-Elliott et Wallace, 2011 ; Magee et Ward, 1869 in Bergey's Manual, 2012). Comme avec d'autres mycobactéries, MCR peuvent encore être séparées par la pigmentation de leurs colonies et leur profil biochimique, telle que l'activité d'arylsulphatase à 3 jours, réduction de nitrate, utilisation des alcools de sucre, utilisation de fer, croissance à 45°C et croissance en présence de NaCl à 5% (Brown-Elliott et Wallace, 2002).

Néanmoins, la classification de *Runyon* a été délaissée par les laboratoires au profit de l'identification des espèces par la caractérisation du profil biochimique (Nolte et Metchock, 1995 in Bendadda, 2003) car chez une même espèce, des souches peuvent être pigmentées, d'autres non-pigmentées ou bien photochromogènes (Pilet *et al.*, 1979 in Bendadda, 2003). La majorité des espèces de mycobactéries sont donc des saprophytes, dont le pouvoir pathogène ne s'exprime que de façon occasionnelle. Mais, certaines espèces appartenant à ce genre sont des pathogènes intracellulaires stricts des animaux (Solatges, 2008). On compte aujourd'hui 158 espèces et sous-espèces reconnues du genre *Mycobacterium* (Boukary *et al.*, 2011).

I-2. Caractères

On distingue les caractères :

I-2.1. Caractères bactériologiques

Bien qu'ayant une structure générale des bactéries à Gram positif (Shinnick et Good, 1995), les mycobactéries nécessitent des colorations spéciales, les plus utilisées sont celles reposant sur l'acido-résistance comme la coloration de *Ziehl-Neelsen* et la celles par fluorescence comme l'auramine (Grace *et al.*, 2017). Les mycobactéries sont des Bacilles Acido-Alcool-Résistants (B.A.A.R) (Maugein et Bébéar, 2003). Elles sont occasionnellement ramifiées (Rastogi *et al.*, 2001).

I-2.2. Caractères morphologiques

Les mycobactéries sont des bactéries en forme de bâtonnets fins (**Figure 1**), souvent légèrement incurvés et immobiles (Long et *al.*, 2000), asporulées, aérobies à micro-aérophiles (Shinnick et Good, 1995). Les cultures isolées de *M. bovis* sont microaérophiles (Aljada et *al.*, 1999). Les mycobactéries ont une taille qui se situe entre 1 et 10 μm de long sur 0,2 et 0,6 μm de large (Babady et Wengenack, 2012). Rarement, certains isolats peuvent être filamenteux et ramifiés (Long et *al.*, 2000). *M. bovis* est un bacille petit de taille, trapu et granuleux (**Thorel, 2003**).

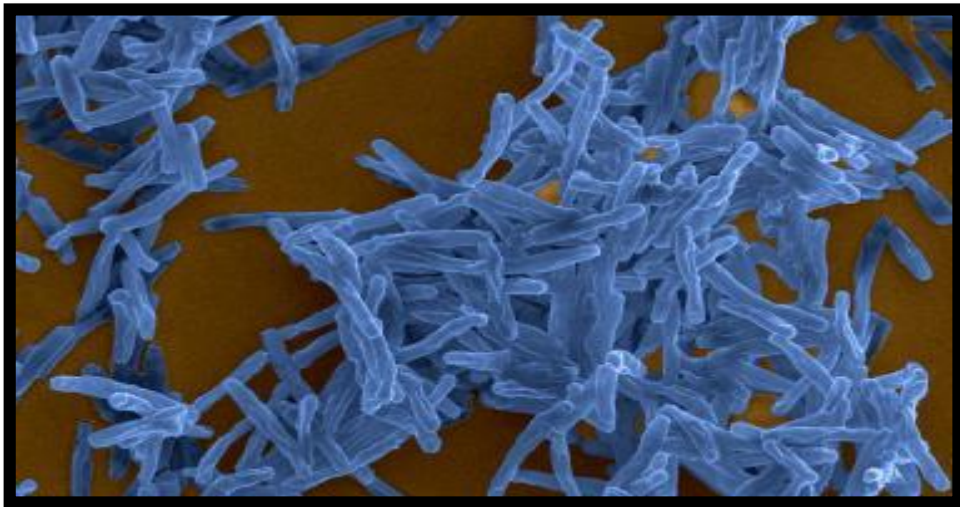


Figure 1 : Bactéries *Mycobacterium tuberculosis* observées sous microscopie électronique à balayage colorisée (Institut Pasteur, 2013)

Du fait d'une paroi hydrophobe et épaisse (**Figure 2**), elles sont acido-alcool-résistantes et, à la différence des autres bactéries, elles peuvent synthétiser des acides mycoliques (acides gras à longues chaînes carbonées), d'où la richesse de cette paroi en lipides (60%) (Faye, 2010 in Donnen, 2011).

La paroi des mycobactéries est composée d'un complexe lié en covalence de trois hétéropolymères ; peptidoglycane, arabinogalactane et acides mycoliques, souvent désignés sous le nom du complexe mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (Brennan, 2003 ; Brennan et Nikaido, 1995). Ce complexe forme une monocouche asymétrique et non-fluide, « décorée » sur sa surface avec des lipides "capsulaires" associés, tels que le monomycolate de tréhalose (TMM), le dimycolate de tréhalose (TDM), les sulfolipides, les glycolipides phénoliques et les dimycoserates de phthiocerole (PDIMs), aussi bien que les polysaccharides complexes et quelques protéines (Daffe et Draper, 1997 ; Draper, 1998 ; Kaur

et *al.*, 2009). En dépit de notre compréhension des structures chimiques impliquées dans le complexe de la paroi des mycobactéries, notre connaissance des détails de leur assemblage demeure incomplète et notre compréhension de leur organisation précise évolue toujours (Hoffmann *et al.*, 2008 ; Sani *et al.*, 2010 ; Zuber *et al.*, 2008).

Les acides mycoliques sont des chaînes longues (C70 à C90) ; les α -alkyls, acides gras β -hydroxy trouvés ancrés directement aux unités terminales d'arabinose, aussi bien que les esters abondants du tréhalose de disaccharide comme TMM et TDM (Barry *et al.*, 1998 ; Minnikin *et al.*, 2002). Ces longues chaînes lipidiques sont les médiateurs primaires du caractère hydrophobe de la paroi de la mycobactérie et forment une monocouche étroitement emballée et imperméable (Brennan, 2003 ; Liu *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 1995 ; Nikaido et Rosenberg, 1993 ; Wang *et al.*, 2000 in Tahlan *et al.*, 2012).

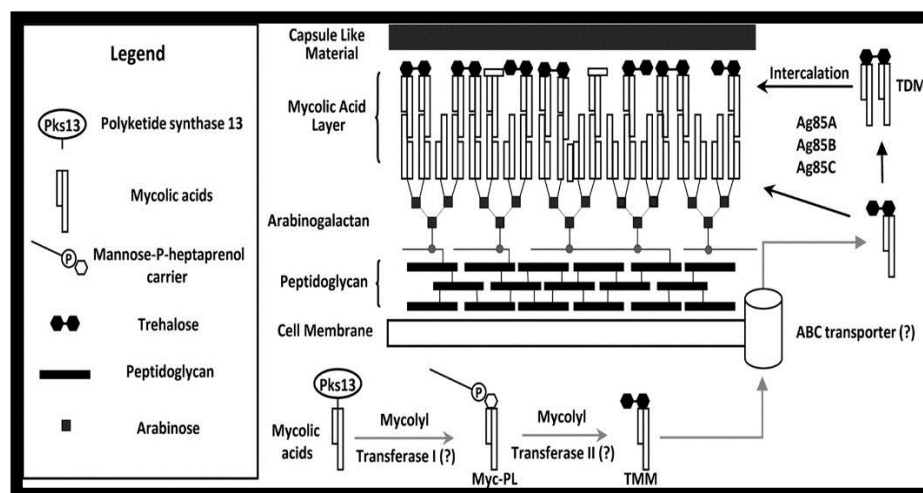


Figure 2 : Représentation schématique de la paroi des mycobactéries (Tahlan *et al.*, 2012)

I-2.3. Caractères cultureux

Les mycobactéries se différencient entre elles par leurs caractères cultureux : selon le groupe de mycobactéries, la croissance est rapide ou lente, les colonies pigmentées ou non et le milieu utilisé est plus ou moins exigeant (Delnatte, 2008). Ces caractères sont évalués par :

a) Milieu

Les mycobactéries sont relativement de croissance lente (Talbot et Raffa, 2015). Elle est de 3 à 4 semaines pour *M. tuberculosis*, 45 à 60 jours pour *M. africanum* et *M. bovis* (Avril *et al.*,

2003). Le temps de génération *in vitro* des mycobactéries est de 18 à 24 heures, tandis que pour la plupart des autres bactéries à croissance rapide il est approximativement de 20 minutes (Talbot et Raffa, 2015). Certaines mycobactéries dites à croissance rapide (MCR) se développent dans les sept jours sur le milieu solide d'agar (Brown-Elliott et Wallace, 2011). La culture des mycobactéries nécessite des milieux spéciaux enrichis à l'œuf comme les milieux de Löwenstein-Jensen ou de Coletsos (Godreuil et *al.*, 2003) , le milieu de Löwenstein-Jensen enrichi de 0,2% de pyruvate est utilisé pour la croissance de *M.bovis* (Sanou et *al.*, 2014). Les caractères des colonies sur les différents milieux.

❖ LÖWENSTEIN-JENSEN :

Les colonies de *M. bovis* sont typiques. A l'isolement, elles apparaissent toujours dans un délai supérieur à un mois. Elles sont petites, lisses, dysgoniques et non pigmentées, elles sont d'abord plates puis elles deviennent ensuite bombées, brillantes mais leur taille ne dépassent pas celle d'une tête d'épingle (Thorel, 2003). Par contre, elles donnent des colonies non pigmentées, à surface rugueuse et sèche (Van Embden et *al.*, 1993 in Orduz et Ribón, 2015), à bord irrégulier en chou-fleur dite «eugoniques» pour *M. tuberculosis* et des colonies rugueuses, plates, de couleur mate avec un bourgeon centrale et à croissance dysgonique pour *M. africanum* (Denis et Martin ,2007).

❖ COLETSOS : La croissance de *M. bovis* est favorisée sur milieu de Coletsos contenant du pyruvate de sodium (Vrain, 2010).

Des colonies de *M. bovis* et *M. tuberculosis* sur milieu solide sont montrées respectivement dans les **Figures 3 et 4**.



Figure 3 : Colonies de *M. bovis*
(Franco et *al.*, 2012)



Figure 4 : Colonies de *M. tuberculosis*
(Van Embden et *al.*, 1993 in Orduz et Ribón, 2015)

b) La température

Selon les mycobactéries, La température d'incubation idéale varie de : 35 à 37°C pour la plupart (Complexe *Mycobacterium avium*, *M. szulgai*, *M. kansasii* ...), 28 à 30°C pour *M. ulcerans*, *M. haemophilium* ou *M. marinum* et 42°C pour *M. xenopi*. Vu que la plupart des mycobactéries poussent plus ou moins rapidement à 37°C, l'idéal est d'incuber la culture à cette température lorsqu'une infection à mycobactérie est suspectée (Andréjak et al., 2011). Sauf pour les prélèvements cutanés qui doivent être incubés également à 28°C.

c) pH

Le pH optimal est de 6,7 à 6,9 (Pilet et al., 1979 in Lompo, 2014). *M. bovis* [Bacille Calmette--Guérin (BCG)] et *Mycobacterium smegmatis* ont été employés comme exemples des mycobactéries à croissance lente et rapide, respectivement. *M. bovis* BCG et *M. smegmatis* sont capables de se développer à des pH de 5.0 et 4.5, respectivement (Rao et al., 2001).

Dans un pH=6*, la croissance de *M. tuberculosis* est limitée, par contre *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* et *M. scrofulaceum* y poussent bien (Piddington et al., 2000).

*Milieu de Sauton modifié.

Ces caractères cultureux permettent une orientation sur l'espèce mycobactérienne mais pas son identification certaine. Les tests biochimiques et/ou moléculaires permettent une identification définitive de la mycobactérie (Delnatte, 2008).

I-2.4. Caractères biochimiques

L'étude des caractéristiques biochimiques repose essentiellement sur la recherche d'acide nicotinique (niacine test), d'uréase, de nitrate réductase, catalase thermosensible, croissance sur PAS (acide paraamino-salicylique) et la croissance en présence de TCH (acide thiophène-2-carboxylique), de cyclosérine et pyrazinamide (Maugein et Bébéar, 2003).

Toutes les mycobactéries du « complexe *M. tuberculosis* » produisent une catalase thermolabile (inactivée à 68°C) (Avril et al., 2003). Par contre, les mycobactéries atypiques ont, à de rares exceptions une activité catalase thermostable (Bourgoin et Agius, 1995).

M. bovis est caractérisé par une catalase négative à 68°C pendant 20 minutes (Diguimbaye, 2004), niacine négative (Diguimbaye, 2004; Ayele et al., 2004 ; Wayne et Kubica, 1986 ;

Niemann et *al.*, 2000 in Kubica et *al.*, 2006), il ne peut pas synthétiser l'acide nicotinique, uréase positive, B-glucosidase négative (Diguimbaye, 2004), nitrate réductase négative (Ayele et *al.*, 2004 ; Wayne et Kubica, 1986 ; Niemann et *al.*, 2000 in Kubica et *al.*, 2006 ; Tarnagda et *al.*, 2014).

M. tuberculosis est caractérisé par une catalase positive à 22°C mais absente à 68°C (Tarnagda et *al.*, 2014), la réduction du nitrate et la production de niacine sont positives (Wayne et Kubica, 1986 ; Niemann et *al.*, 2000 in Kubica et *al.*, 2006 ; Tarnagda et *al.*, 2014).

La méthode qui consiste à la recherche de la croissance de mycobactéries dans des milieux contenant des substances inhibitrices a été employée pour l'identification d'espèce. La croissance du complexe *M. tuberculosis* (CMT) est inhibée par l'acide rho-nitrobenzoïque (PNB), tandis que les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) sont résistantes au PNB (Giampaglia et *al.*, 2007 ; Sharma et *al.*, 2010).

Le test de l'acide Para Nitro-benzoïque (PNB) et celui de p-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropionophenone (NAP) sont utilisés pour différencier *M. tuberculosis* et *M. bovis* des autres mycobactéries ou mycobactéries non tuberculeuses (Collins et Levett, 1989).

Le test de l'Hydrazide de l'acide Thiophène 2 Carboxylique (TCH) est utilisé pour distinguer les souches de *M. tuberculosis* des souches de *M. bovis* (Collins et Levett, 1989). *M. tuberculosis* est résistant au TCH (Tarnagda et *al.*, 2014), donc il se développe sur ce milieu (Tsukamura et Tsukamura, 1965 ; Wayne et Kubica, 1986 ; Niemann et *al.*, 2000 in Kubica et *al.*, 2006), tandis que *M. bovis* ne donne pas de colonies sur le milieu de TCH (Tsukamura et Tsukamura, 1965) à cause de sa sensibilité à de l'Hydrazide de l'acide Thiophène 2 Carboxylique (Waecker et *al.*, 2000 ; « Ayele et *al.*, 2004 ; Wayne et Kubica, 1986 ; Niemann et *al.*, 2000 » in Kubica et *al.*, 2006) mais il est résistant au pyrazinamide (Waecker et *al.*, 2000).

Les caractères de différenciation des espèces mycobactériennes sont rapportés dans le **Tableau 1.**

Tableau 1 : Les caractères de différenciation entre espèces du complexe *M. tuberculosis* et les M.N.T (Niemann et *al.*, 2002; Leao et *al.*, 2004 ; Aranaz et *al.*, 2003).

<i>Mycobacterium</i>	<i>M.bovis</i>	<i>M.caprae</i>	<i>M.tuberculosis</i>	M.N.T
Morphologie des colonies	Dysgonique	Dysgonique	Eugonique	/
Pigment	Absent	Absent	Absent	présent ou absent
Croissance sur milieu Lebek	Micro-aérophile	Micro-aérophile	Aérobie	/
Niacine accumulation	-	-	+	-/+
Nitrate réductase	-	-	+	-/+
Croissance en présence de pyrazinamide	R	S	S	/
Croissance en présence de TCH	S	S*	R**	+
Croissance en présence de PNB	-	-	-	+

TCH : Hydrazide de l'acide Thiophène 2 Carboxylique, PNB : acide Para Nitro-benzoïque. R : Résistant, S : Sensible.

*Résistant à 1 et 2 mg d'hydrazide d'acide 2-thiophèncarboxylique (TCH) ml⁻¹, mais sensible à 5 et 10 mg de TCH ml⁻¹

**TCH: *M. tuberculosis* (classical); R, *M. tuberculosis* (Asian); S.

-/+ = principalement négatif.

I-3. Résistance et sensibilité

L'humidité et la température sont les principaux facteurs qui influencent la persistance des mycobactéries dans l'environnement (Tanner et Michel, 1999).

❖ Résistance :

Les bactéries du complexe *M. tuberculosis* ont une paroi hydrophobe et épaisse. Elles sont capables de synthétiser des acides mycoliques (paroi riche en lipides) (Faye, 2010 in Donnen, 2011). Ces propriétés leur confèrent :

-une résistance naturelle aux désinfectants et agents chimiques (Denis et Martin, 2007 in Donnen, 2011) ;

-une capacité à s'associer avec les matières organiques ce qui explique en partie :

Leur bonne résistance au froid,

Leur sensibilité à la chaleur (pasteurisation) et aux ultraviolets (Palmer et Whipple, 2006 in Donnen, 2011).

Dans le milieu extérieur contaminé, les bacilles desséchés et conservés à l'obscurité restent virulents pendant au moins cinq mois, mais ils ne restent virulents que 40 jours environ s'ils sont conservés à la lumière solaire. Le bacille tuberculeux peut résister dans les bouses des animaux jusqu'à deux mois en été et cinq mois en hiver (Bénet *et al.*, 2014).

Les mycobactéries résistent vis-à-vis des:

a) Agents physiques : les bacilles tuberculeux sont résistants au froid et à la dessiccation (Bénet *et al.*, 2016; Flandrois *et al.*, 1997). La lyophilisation est d'ailleurs un excellent moyen pour leur conservation (Gonzalez *et al.*, 1998).

b) Agents chimiques : elles sont beaucoup plus résistantes que les autres bactéries usuelles aux désinfectants chimiques et aux antiseptiques (Bénet *et al.*, 2016 ; Jawetz *et al.*, 1973) et cela grâce à la nature hydrophobe de leur surface cellulaire et à leur croissance en grappe (Jawetz *et al.*, 1973).

Le bacille tuberculeux est peu sensible aux acides et bases dilués ou détergents divers (Flandrois *et al.*, 1997). Le composé d'ammonium quaternaire, le gluconate de chlorhexidine et un iodophore sont inefficaces contre *M. tuberculosis* (Best *et al.*, 1990).

❖ Sensibilité : les mycobactéries sont sensibles vis-à-vis des:

a) Agents physiques : elles sont sensibles à la chaleur (20 minutes à 60°C ; 20 secondes à 75°C) (Crozet *et al.*, 2021). Elles sont également sensibles à la lumière, aux ultraviolets (UV) et aux rayons X (Bénet *et al.*, 2016; Flandrois *et al.*, 1997).

b) Agents chimiques : ces bacilles sont généralement sensibles aux désinfectants iodés, chlorés, crésolés et formolés (Lompo, 2014). Le bacille tuberculeux est rapidement tué par l'alcool dilué (alcool à 70°). La dénomination exacte devrait être « à coloration acido et alcool résistante » : la résistance à l'action de l'alcool ne concerne donc que la coloration selon Ziehl (Flandrois *et al.*, 1997).

Antibiotiques :

Les médicaments antituberculeux essentiels utilisés lors du traitement de la tuberculose sont : l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, le pyrazinamide, la streptomycine et la thioacétazone (Maher *et al.*, 1997). Or, des résistances ont été rapportées dans le traitement

de la tuberculose concernant isoniazide, rifampicine (Hillemann et *al.*, 2005 ; Barnard et *al.*, 2008) et l'éthambutol (Zhao et *al.*, 2005 ; Johnson et *al.*, 2006).

Une tuberculose est dite *multirésistante* si l'antibiogramme montre une résistance au minimum à la rifampicine et à l'isoniazide (Sharma et Mohan, 2004).

CHAPITRE II : LA TUBERCULOSE BOVINE

II-1. Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse (Marušić et Janković, 2012), contagieuse (Guillet-Caruba et *al.*, 2014), transmissible et d'allure chronique (Marušić et Janković, 2012). Commune à l'homme et aux animaux (Wilkins et *al.*, 2008). Elle est causée par une bactérie appartenant au « complexe *M. tuberculosis* » qui comprend notamment *M. tuberculosis* et *M. bovis* (Thoen, 2009). Elle est caractérisée par le développement progressif des lésions granulomateuses spécifiques ou des tubercules dans le tissu pulmonaire, les nœuds lymphatique ou dans d'autres organes (Jenkins et *al.*, 2011). En Algérie, c'est une maladie à déclaration obligatoire (Journal officiel de la république Algérienne, 1995).

II-2. Historique

La tuberculose chez l'homme a été décrite depuis l'Antiquité (Mathuria, 2009). Une déformation vertébrale compatible avec mal de Pott a été retrouvée sur un squelette d'enfant Egyptien, cette déformation suggère une tuberculose vertébrale, le séquençage d'un fragment d'ADN a révélé une séquence originale de *Mycobacterium* (Crubezy et *al.*, 1998).

- En 1810, Laennec découvrit le stéthoscope pour l'auscultation. Après neuf ans (1819), il effectua une étude nécrosique et clinique complète de la maladie, cette étude lui permit d'affirmer l'unicité de la tuberculose (Thorel, 2003).
- 1882 : Robert Koch mit en évidence le bacille tuberculeux à partir de lésions humaines (ce bacille est souvent désigné, depuis, comme Bacille de Koch ou B. K.) puis il cultiva ce microorganisme sur sérum de cheval coagulé. Koch considéra qu'un même bacille était responsable de la tuberculose naturelle de plusieurs espèces comme l'homme, les bovins, le singe, le lapin, la poule et le cobaye (Bénet, 2009).
- A partir de 1889, des recherches réalisées et menèrent à distinguer les trois bacilles qui sont classés, ultérieurement, en différentes espèces, à savoir ; *M. bovis* (bovin), *M. tuberculosis* (humain) et *M. avium* (aviaire) (Bénet et *al.*, 2016).
- Entre 1908 et 1920, une souche de *M. bovis* fut repiquée sur la pomme de terre biliée par deux chercheurs messieurs Calmette et Guérin d'où le nom BCG (Bacille de Calmette et Guérin). Le BCG fut appliqué à l'homme pour la première fois en 1921, initialement administré par voie orale (Bénet, 2009).

II-3. Répartition :

Dans le monde :

La tuberculose bovine est présente dans le monde entier, mais sa fréquence varie d'un pays à un autre (Bénet et *al.*, 2014). Il est estimé qu'environ 50 millions de bovins sont infectés par *M. bovis* dans le monde (Buddle et *al.*, 2011).

Actuellement, la tuberculose bovine est rare en Amérique du Nord et dans la plupart des pays d'Europe Occidentale. Cependant, Elle est fréquente dans quelques pays d'Afrique, d'Amérique du Sud, ou d'Asie (Bénet et *al.*, 2016).

Néanmoins, la persistance de *M. bovis* chez les espèces sauvages a énormément compromis les efforts d'éradication dans les pays comme la Nouvelle Zélande, l'Irlande, le Royaume-Uni de Grande-Bretagne et dans quelques parties des États-Unis d'Amérique (FAO, 2012). Dans la plupart des pays en voie de développement, la tuberculose bovine est souvent négligée (Cosivi et *al.*, 1998) et elle est donc largement diffusée (Ayele et *al.*, 2004).

En Afrique

La tuberculose à *M. bovis* est parmi les principales maladies entraînant des pertes économiques évaluées chaque année à plusieurs dizaines de millions de dollars (Boukary et *al.*, 2011). En plus, il y a des interactions très complexes entre le système semi-intensif dans les milieux urbains et les systèmes pastoraux de bétail pratiqués dans les milieux rural (Thys et *al.*, 2006 in Boukary et *al.*, 2012 ; Boukary et *al.*, 2007 in Boukary et *al.*, 2012).

À notre connaissance, parmi les 55 pays africains, seuls sept (Afrique du Sud, Algérie, Burkina Faso, Cameroun, Maroc, Namibie et Zambie) considèrent la tuberculose bovine comme une maladie à déclaration obligatoire et appliquent des mesures de contrôle des maladies (dépistage et d'abattage) et les 48 pays restants contrôlent mal ou pas du tout la maladie (Cosivi et *al.*, 1998).

En Algérie

Le bétail bovin algérien est loin d'être complètement identifié et les programmes de contrôle de son mouvement ne sont pas convenablement établis (Sahraoui et *al.*, 2009). L'Algérie est un pays reconnu infecté de la tuberculose bovine (Sahraoui et *al.*, 2008). Le problème de la tuberculose bovine est négligé, il n'y a pas de données fiables sur l'ampleur de la maladie. Les informations sur la prévalence et la distribution de la tuberculose font défaut.

Aussi, la recherche de la tuberculose bovine repose uniquement sur le dépistage *ante mortem* représenté par le test cutané ; l'intradermo-réaction à la tuberculine (IDR), et sur la recherche, en *post mortem*, des lésions suspectes à l'abattoir. La plupart des cas de tuberculose sont découverts en *post mortem* lors de l'inspection quotidienne des carcasses et abats de bovins porteurs de lésions macroscopiques suspectes de tuberculose (Sahraoui et *al.*, 2009).

Malgré les efforts consentis par les services vétérinaires dans le contrôle sanitaire vétérinaire, certaines insuffisances persistent, comme les abattages clandestins où un nombre d'animaux abattus (notamment les caprins) n'est pas soumis à l'inspection des carcasses dans les abattoirs (Sahraoui et *al.*, 2011a) ce qui complique encore les tâches des pouvoirs publics.

II-4. Sources de contagion

Les individus tuberculeux et les matières virulentes constituent une source de contagion. Ces matières virulentes sont représentées par des tissus comme les organes et les ganglions atteints de tuberculose, la viande (notamment si elle est à proximité du foyer tuberculeux et lors des formes évolutives de la maladie) et le sang mais il est à noter que la bacillémie est rare et transitoire (elle survient lors de la phase aiguë de la maladie et surtout lors de sa phase terminale) (Bénet et *al.*, 2014). Les matières virulentes sont aussi représentées par des excréments dont leur rôle dépend du siège du foyer tuberculeux ;

- ✓ Le jetage, les expectorations et la salive sont responsables de la transmission aérienne par la dissémination dans l'atmosphère de gouttelettes contenant des bacilles tuberculeux (Bénet et *al.*, 2014). L'excrétion respiratoire et l'inhalation de *M. bovis* sont considérées comme la principale voie de transmission de la tuberculose entre les bovins (Menzies et Neill, 2000).
- ✓ Les excréments : les urines et les matières fécales (qui parfois très riches en bacilles) sont respectivement des sources de contagion en cas de tuberculose rénale (ou tuberculose généralisée) et digestive (Bénet et *al.*, 2014).
- ✓ Le lait : lors d'une infection mammaire, le lait peut être contagieux, même en l'absence de lésions visibles macroscopiquement (Bénet et *al.*, 2014). Le lait joue un rôle important dans la transmission de l'infection à l'homme (la tuberculose zoonotique) et aux veaux (Bénet et *al.*, 2016).
- ✓ Les lésions cutanées peuvent parfois être riches en bacilles.

- ✓ Le sperme en cas de lésions du testicule ou de l'épididyme.
- ✓ Les sécrétions utérines : en cas de métrite tuberculeuse chez les bovins (Bénet et *al.*, 2016).

Le milieu extérieur peut être une source secondaire de contamination. Cependant, sa participation dans la contagion dépend de la durée de survie des mycobactéries (Humblet et *al.*, 2009).

II-5. Modes de transmission

La transmission peut être ;

- a) Horizontale : mode horizontal direct est le mode de transmission le plus fréquent, comme un contact étroit et prolongé, la tété et le coït. Le mode horizontal indirect est représenté par le milieu extérieur souillé et les matières virulentes (Koffi, 1992).
- b) Transmission verticale

La transmission *in utero* est absente, le jeune animal issu de mère atteinte de tuberculose naît sain mais il peut se contaminer lors de la tété en cas de tuberculose mammaire (Bénet et *al.*, 2014). Or, en 2007, les chercheurs turcs ont découvert, chez un veau âgé de 15 jours, un cas de tuberculose généralisée suspect d'avoir une origine congénitale (infection *in utero* par aspiration du liquide amniotique) (Ozyigitet *al.*, 2007).

II-6. Voies de pénétration

Les principales voies de pénétration sont :

- a) Voie respiratoire

C'est la voie de pénétration la plus souvent rencontrée chez les bovins, le chien et l'Homme, elle se fait par inhalation de microparticules excrétées par les organismes tuberculeux (Bénet et *al.*, 2014). Son efficacité est expliquée par le fait que les défenses immunitaires sont les plus faibles au niveau des alvéoles où les bacilles vont se déposer (Bénet, 2009).

- b) Voie digestive

Elle se résulte suite à une consommation de lait infecté (veau, chat...), de viandes ou d'abats (carnivores) et aussi suite à une coprophagie (volailles) (Bénet et *al.*, 2014).

c) Autres voies

D'autres voies ont été décrites, à savoir la voie vénérienne, la voie cutanée (souillure de plaie rencontrée principalement chez l'Homme) et la voie conjonctivale (possible) (Bénet et *al.*, 2014).

II-7. Etiopathogénie, Symptômes et Lésions

II-7-1. Etiologie

La tuberculose humaine et animale est causée par des espèces mycobactériennes appartenant au « complexe *M. tuberculosis* » (CMT). Ce dernier inclut *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* et *Mycobacterium pinnipedii* (Jenkins et *al.*, 2011).

La tuberculose bovine est une maladie infectieuse causée par *Mycobacterium bovis* (Musoke et *al.*, 2015). Par ailleurs, cette bactérie est responsable de la tuberculose des autres ruminants, elle peut infecter l'homme ainsi que animaux domestiques et sauvages (Bénet et *al.*, 2014; Chartier, 1991; Kinne et *al.*, 2006 ; Amanfu, 2006).

II-7-2. Pathogénie

Après pénétration dans l'organisme, le plus souvent par voie respiratoire, *M. bovis* est à l'origine d'une infection qui se déroule généralement en deux phases (Matrat, 2014). Dans le déroulement de la tuberculose, il est possible de distinguer schématiquement deux étapes, à savoir ; étape primaire (primo-infection) et étape secondaire (Bénet, 2009).

a) Etape primaire (primo-infection)

Après leur pénétration dans l'organisme, ces bacilles sont rapidement phagocytés par les macrophages (Bénet et *al.*, 2016). Ces dernières sont les cellules hôtes primaires pour la croissance intracellulaire de *M. bovis* (Pollock et *al.*, 2006). La partie phagocytée non détruite (dans le cas où les macrophages ne sont pas suffisamment efficaces, ou la dose bactérienne est trop importante) se multiplie dans les phagocytes (Bénet et *al.*, 2016). Cette multiplication locale mène, en quelques jours, à la formation d'une lésion initiale (chancre d'inoculation). Le drainage lymphatique des mycobactéries aboutit à la formation d'une lésion tuberculeuse du nœud lymphatique locorégional selon la «loi d'adénopathie satellite de PARROT». Le chancre

d'inoculation plus l'adénopathie satellite forme le complexe primaire dont la localisation révèle la porte d'entrée du bacille. Chez les bovins et les autres ruminants, la porte d'entrée est pulmonaire dans 95 % des cas, digestive chez la volaille et le porc, et à part égale entre ces deux voies (pulmonaire et digestive) pour les carnivores (Bénet et *al.*, 2016).

Quand l'un des deux éléments (le chancre ou l'adénite) manque, le complexe est dit incomplet ou dissocié (Dubois, 2002).

Le complexe primaire peut se transformer selon trois situations distinctes : la guérison, la stabilisation ou la généralisation précoce (Dubois, 2002).

La guérison est marquée par une efficacité de la réaction immunitaire, où cours de laquelle les défenses spécifiques et non spécifiques sont efficaces, ce qui conduit à une destruction et élimination des mycobactéries. Fréquente lors de l'infection des bovins par *M. avium* ou *M. tuberculosis*.

La stabilisation est le résultat d'un équilibre entre les défenses de l'organisme et les mycobactéries (Dubois, 2002).

En effet, dans certaines situations défavorables, comme la multiplication des bacilles tuberculeux et leur passage par la voie lymphe-hématogène, une tuberculose de généralisation précoce s'installe. Elle se s'exprime par une généralisation aiguë précoce (les lésions toutes au même stade évolutif) ou une généralisation précoce ralentie (les lésions sont à des stades évolutifs différents) (Dubois, 2002).

Ces formes peuvent se stabiliser, c'est-à-dire passer à l'état quiescent, caractérisées par :

- Calcification
- Enkystement
- Remaniement fibreux.

Ces trois formes stabilisées peuvent cesser d'évoluer durant toute la vie de l'animal, ou donner lieu à une généralisation tardive (Thorel, 2003).

Chez les bovins, la primo-infection est souvent asymptomatique et sera mise en évidence par une réaction tuberculique positive (Panteix, 2007 in Faye, 2010). Par ailleurs, une surinfection endogène ou exogène peut être à l'origine d'une tuberculose chronique d'organe si les moyens de défense de l'organisme sont performants. Dans le cas d'une diminution de l'état général, la surinfection se propage induisant une tuberculose de généralisation tardive : une tuberculose

milliaire aiguë ou une tuberculose caséuse de surinfection (**Figure 5**). Néanmoins, ces deux formes sont capables de donner une poussée évolutive ou une stabilisation définitive (Thorel, 2003).

b) Etape secondaire

Dans le cas de la tuberculose chronique d'organe, les lésions tuberculeuses sont regroupées dans un seul organe. Les lésions tuberculeuses peuvent s'ouvrir sur une voie de drainage (formes ouvertes), ces lésions sont le plus souvent de nature caséuse. Cette forme peut se stabiliser ou se généraliser (Bénet et *al.*, 2016).

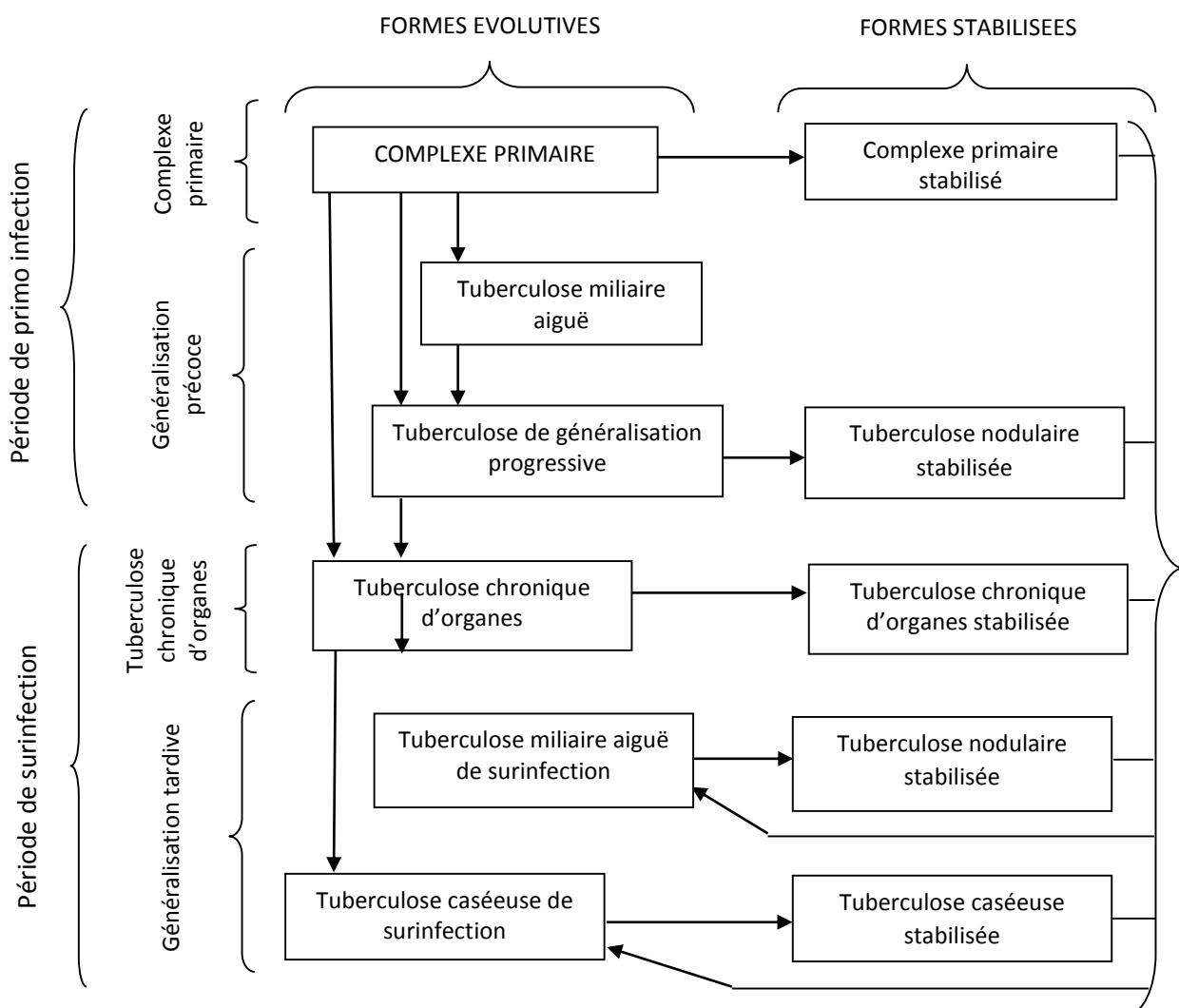


Figure 5 : Pathogénie et évolution de la tuberculose animale (Thorel, 2003).

c) Développement d'une immunité exclusivement cellulaire

Cette immunité se manifeste par une mobilité importante des macrophages, un important processus de phagocytose et une capacité élevée de la lyse des corps bactériens déjà phagocytés. Néanmoins, cette immunité est relative et elle est aisément surpassée lors de l'atteinte de l'état général de l'organisme ou de réinfections massives ou répétées. Par conséquent, la vaccination d'un animal contre la tuberculose paraît très dangereuse et cela pour des raisons épidémiologiques et hygiéniques. Par conséquent, la prophylaxie de la tuberculose animale est exclusivement sanitaire (Bénet *et al.*, 2016).

II-7.3. Symptômes

Ils se caractérisent par une évolution lente, chronique, sur plusieurs mois voire des années. Cette maladie se caractérise par la fréquence des formes cliniquement silencieuses « *Il y a plus d'infectés que de malades* » (Bénet *et al.*, 2016).

La tuberculose maladie se manifeste par (Bénet, 2009) :

- Grande diversité des aspects cliniques : tous les tissus et organes peuvent être touchés. La localisation du processus est selon l'espèce et le mode de contamination.
- Expressions cliniques sont peu caractéristiques, en dehors de quelques localisations particulières. Mais, elles sont caractérisées, en fin d'évolution, par une atteinte considérable de l'état général, dominée par l'amaigrissement des animaux touchés.
- Absence de corrélation entre l'importance des lésions tuberculeuses et l'intensité des manifestations cliniques observées (Bénet, 2009).

Le tableau clinique dépend de la localisation des lésions (pulmonaire, mammaire, viscérale, osseuse, cutanée ou génitale) et de l'espèce mycobactérienne incriminée. Par conséquent, la tuberculose se caractérise par une grande diversité des aspects cliniques (Dubois, 2002). En règle générale, le seul symptôme de la maladie est l'hypertrophie des nœuds lymphatiques. Dans les phases plus avancées, l'atteinte, quand elle se manifeste, est principalement située au niveau de l'appareil respiratoire (Whipple *et al.*, 1996 in Bénet *et al.*, 2016 ; Costello *et al.*, 1998 in Bénet *et al.*, 2016).

II-7.4. Lésions

Il existe deux types de lésions ; macroscopiques et microscopiques.

II-7.4.1. Lésions macroscopiques

Les lésions tuberculeuses visibles peuvent être localisées et bien délimitées : *le tubercule*, ou bien étendues et mal délimitées : ce sont des *épanchements et des infiltrations tuberculeux* (Bénet et *al.*, 2016).

Tubercules : d'un point de vue lésionnel et lors de l'examen visuel, le tubercule (**Figure 6 et 7**) peut être de consistance caséuse, calcifiée-caséifiée ou complètement calcifiée, parfois purulent, de couleur jaunâtre ou grisâtre et il peut avoir de différentes tailles. Les nodules peuvent être de grande taille au point d'occuper parfois la majeure partie de l'organe sur lequel ils apparaissent, mais peuvent être trop petits au point que le vétérinaire inspecteur n'arrivera pas les distinguer à l'œil nu. A la palpation, le vétérinaire sent une hypertrophie du ganglion ou des nodules sur le parenchyme pulmonaire. A l'incision, le vétérinaire sent un grincement et une résistance, la lésion peut se présenter sous différentes natures (caséifiée ou calcifiée) et couleurs (blanc jaunâtre à un gris-verdâtre). La caséification peut se présenter sous un aspect granuleux ou sous une consistance crémeuse. Les ganglions déjà caséifiés, se calcifient rapidement. Des cavités sur le parenchyme pulmonaires sont parfois rencontrées. Il arrive parfois que des lésions sont si petites que le vétérinaire inspecteur peut facilement les omettre en ne réalisant qu'une seule incision (Nigsch et *al.*, 2014).

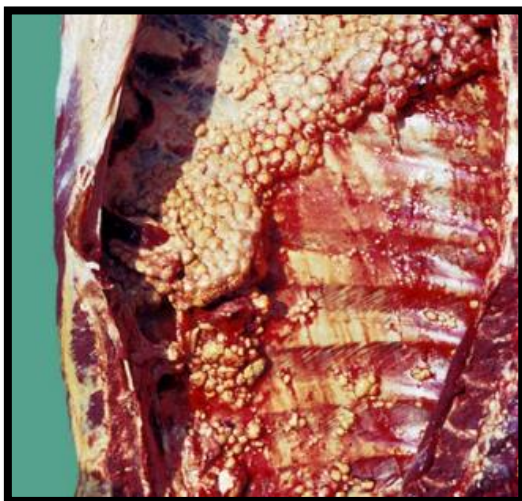


Figure 6 : Tuberculose dans la cage thoracique et la plèvre (Nigsch et *al.*, 2014)

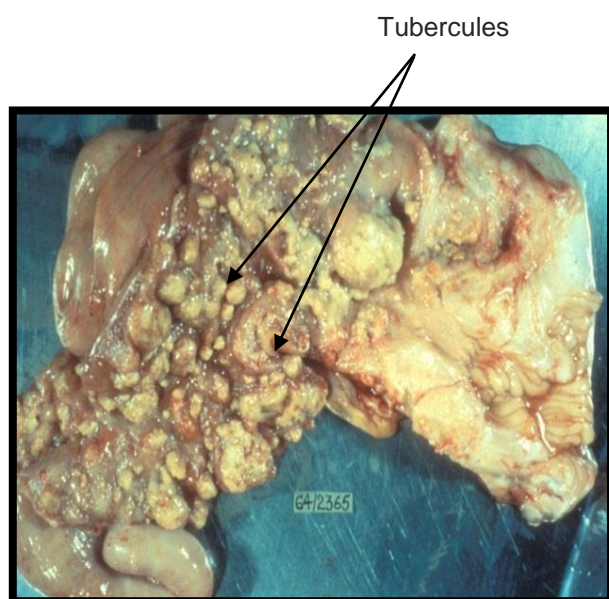


Figure 7 : Tuberculose de l'utérus (endomètre) (Pavulraj, 2013)

II-7.4.2. Lésions microscopiques :

Le follicule tuberculeux : lésion spécifique et c'est la lésion microscopique la plus représentative. Il est formé d'un centre nécrotique homogène (caséum), d'une couronne de cellules (macrophages, histiocytes), d'une deuxième couronne totalement lymphocytaire. Cette lésion peut évoluer vers une calcification du caséum, avec fibrose périphérique (Bénet, 2009).

Chapitre III : DEPISTAGE, DIAGNOSTIC, TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

III- 1. Dépistage allergique

L'infection d'un troupeau par le bacille de la tuberculose se traduit normalement par la découverte d'un ou plusieurs animaux tuberculeux, suite à un test de tuberculination de contrôle et/ou à une inspection de carcasses aux abattoirs

III-1.1. La tuberculination

En 1908, Mantoux a mis au point l'intradermoréaction sur les bovins. Puis en 1909, Roussel l'a testée pour la première fois sur les chiens (Dubois, 2002).

C'est un test tuberculinique intradermique *in vivo* qui met en évidence une réaction d'hypersensibilité de type retardée suite à l'injection intradermique, chez un animal infecté par le bacille tuberculeux, d'une substance appelée « tuberculine » (De la Rua-Domenech et *al.*, 2006b; Faye, 2010).

La tuberculine : La tuberculine est une substance obtenue d'une culture de bacille tuberculeux, elle est capable de déceler l'état d'hypersensibilité retardée d'un sujet infecté et ce, à des doses incapables de sensibiliser et ni de provoquer aucune réaction chez des sujets sains. C'est un allergeo-haptène, aussi appelé PPD (Purified Protein Derivated) (Bénet et *al.*, 2016).

III-1.2. Méthodes de tuberculination

L'intradermotuberculination peut être simple ; l'intradermotuberculination simple (IDS), ou bien comparée ; l'intradermotuberculination comparée (IDC).

III-1.2. 1. Intradermotuberculination simple (I.D.S) :

C'est une méthode dont la sensibilité et la spécificité sont supérieures à 90% (Acha et Szyfres, 1989 in Delafosse et *al.*, 2002 ; ENVF, 1990 in Delafosse et *al.*, 2002). Elle consiste à injecter de la tuberculine dans l'épaisseur du derme de l'encolure puis à apprécier, au bout de 72 h, la réaction au point d'injection (Bénet, 2009).

III-1.2. 2. Intradermotuberculination comparative (I.D.C) :

C'est une méthode avec une excellente spécificité (> 95%) mais qui est peu sensible (50 à 80%) (ENVF, 1990 in Delafosse et *al.*, 2002, Quirin et *al.*, 2001 in Delafosse et *al.*, 2002). Au niveau de l'encolure, l'opérateur injecte, dans l'épaisseur du derme, deux tuberculines, à savoir : la

tuberculine bovine et la tuberculine aviaire dans deux endroits séparés de 20 cm. Après 72h, il doit apprécier les réactions aux points d'injection (Delafosse et *al.*, 2002).

Le principe de l'IDC est de comparer la réaction obtenue au point d'inoculation suite à une injection de tuberculine bovine, à celle obtenue suite à une injection de tuberculine aviaire pratiquée en même temps : la réaction la plus forte oriente le diagnostic (Bénet et *al.*, 2016). Les mycobactérioses non spécifiques se manifestent de façon plus forte par l'épreuve de la tuberculine aviaire, cela est dû une parenté plus grande de *M. avium* avec différentes mycobactéries atypiques qu'avec les bacilles tuberculeux bovin et humain (Bénet et *al.*, 2016).

III-2.Diagnostic

Il est basé principalement sur le diagnostic clinique, au laboratoire, allergique et différentiel.

III-2.1. Diagnostic clinique

Les manifestations cliniques de la tuberculose chez les bovins sont peu caractéristiques et tous les organes et tissus peuvent être touchés. Par conséquent, le diagnostic clinique est difficile (Bénet, 2009). D'autres diagnostics complémentaires sont nécessaires, à savoir :

III-2.2. Diagnostic différentiel

Les principales infections pouvant prêter à confusion, chez les bovins adultes, sont ; l'actinobacillose et l'actinomyose (lymphatique, pulmonaire ou osseuse), adénopathie hépatique et splénique de la leucose lymphoïde, adénite banale, brucellose génitale (endométrite, orchite) et quelques tumeurs des séreuses (Thorel, 2003).

III-2.3. Diagnostic nécropsique

La recherche systématique et quotidienne de lésions suspectes de tuberculose lors de l'inspection *post-mortem* des carcasses et abats de bovins à l'abattoir a deux objectifs principaux : d'une part, garantir, la salubrité de la carcasse et ses abats ; en présence de lésions évocatrices, le vétérinaire doit retirer de la consommation humaine et animale tous les produits capables de présenter un danger pour la santé publique. Cette recherche permet, d'autre part, une surveillance passive de la tuberculose, qu'elle soit réalisée en routine ou bien ciblée dans le cadre de l'abattage diagnostique (Boireau, 2015).

Bien que la recherche systématique de la tuberculose lors de l'inspection *post mortem* à l'abattoir soit réalisée de manière continue, et qu'elle complète convenablement le dépistage

ante mortem (par intradermo tuberculation), elle présente différents inconvénients ; c'est une technique longue qui demande du temps et qui demande aussi la formation des inspecteurs à la détection et la reconnaissance des lésions. Aussi, dans le cas des jeunes bovins nouvellement infectés, la probabilité qu'ils soient porteurs de lésions macroscopiques visibles est faible et donc cette technique permet de détecter des lésions lors des stades avancés de la maladie. D'autre part, tout bovin infecté n'est pas forcément porteur de lésions, et pourra donc échapper à l'inspection *post mortem* (Whipple *et al.*, 1996 in Boireau, 2015 ; Probst *et al.*, 2011 in Boireau, 2015 ; Wadhwa *et al.*, 2012 in Boireau, 2015).

Les nœuds lymphatiques bronchiques, trachéobronchiques, rétropharyngiens et médiastinaux sont les sites préférentiels des lésions suspectes de tuberculose bovine chez le bovin. De plus, les poumons, le foie et la rate sont souvent atteints lors des stades suffisamment avancés de la maladie. Au niveau pulmonaire, les lésions sont généralement de type nodulaire. Le granulome tuberculeux a un aspect jaunâtre et de consistance caséuse, caséo-calcaire, calcifiée voire purulente. Concernant la taille, les auteurs rapportent qu'il existe une grande variabilité dans la taille des lésions présentes sur les carcasses (Whipple *et al.*, 1996 in Boireau, 2015 ; Cassidy *et al.*, 1999 in Boireau, 2015 ; Araújo *et al.*, 2005 in Boireau, 2015).

En ce qui concerne la recherche de la tuberculose dans les abattoirs, les mesures d'inspection standardisées sont basées sur l'examen visuel de plusieurs organes ou parties et parfois leur palpation et incision, comme les poumons, avec les ganglions trachéobronchiques et médiastinaux, la tête et la gorge, avec les ganglions sous-maxillaires, rétropharyngiens et parotidiens, le tractus gastro-intestinal et du mésentère avec les ganglions lymphatiques stomacaux et mésentériques, la mamelle et de ses ganglions et enfin le foie, le pancréas, les reins et de leurs ganglions, ainsi que de la rate (Boireau, 2015).

L'incision du reste de la carcasse peut être effectuée si le vétérinaire de l'abattoir le juge nécessaire, il est également responsable de l'examen total de la carcasse. En cas de lésions douteuses et le vétérinaire le juge nécessaire, des prélèvements peuvent être réalisés et envoyés au laboratoire. Cette inspection varie légèrement d'un pays à un autre, cependant les nœuds lymphatiques incisés régulièrement sont très souvent ceux de la cavité thoracique et de la tête (Sieng, 2011).

En résumé, le dépistage nécropsique de la tuberculose bovine est un examen de routine réalisé à l'abattoir pour la recherche des lésions notamment des lésions tuberculeuses mais il ne permet de détecter que les bovins présentant des lésions macroscopiquement visibles (Whipple *et al.*, 1996 in Bénet *et al.*, 2016; Probst *et al.*, 2011 in Bénet *et al.*, 2016; Wadhwa *et al.*, 2012 in Bénet *et al.*, 2016). Les organes porteurs de lésions macroscopiques visibles et les nœuds lymphatiques associés sont prélevés et envoyés au laboratoire pour réaliser des examens complémentaires (mise en culture, PCR, analyse histologique) (Bénet *et al.*, 2016).

III-2.4. Diagnostic au laboratoire :

Les prélèvements réalisés doivent être conservés réfrigérés à froid positif, ou congelé à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ si l'envoi ne peut pas être effectué dans les 48h (Fediaevsky et Gay, 2013).

III-2.4.1. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique comporte la bactérioscopie et la bactériologie.

Bactérioscopie :

L'examen microscopique d'un produit pathologique est la première étape du diagnostic de la tuberculose et parfois la seule dans les pays en voie de développement. Cet examen permet la mise en évidence des bacilles tuberculeux après coloration de Ziehl-Neelsen ou par l'utilisation de l'auramine en microscopie à fluorescence. Néanmoins, l'examen direct n'est pas sensible car le prélèvement n'est positif que lorsqu'il contient au moins 10.000 bacilles par millilitre (Dupeyron, 2008).

❖ Coloration de ZIEHL-NELSEEN :

Cette technique révèle le caractère acido-alcool-résistant des bacilles (B.A.A.R) (Varshney *et al.*, 2009). Ces derniers apparaissent en rouge sur un fond bleu (Kurniawardhani *et al.*, 2018) (**Figure 8**). Elle comporte les étapes suivantes (U.I.C.T.M.R., 2000) :

- Fixation du frottis.
- Coloration des bactéries par la fuchsine phéniquée.
- Décoloration par l'acide sulfurique à 25 % ou d'une solution d'alcool-acide.
- Enfin, une contre coloration réalisée par le bleu de méthylène à 0,3 %.

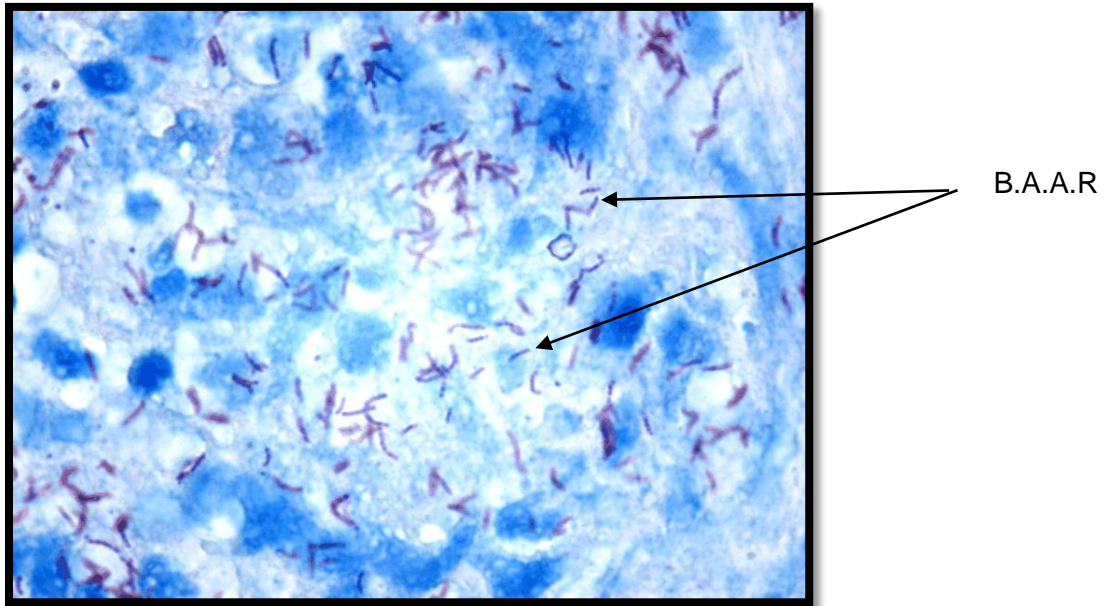


Figure 8 : Bacilles tuberculeux colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen (Man et *al.*, 2016)

✓ Coloration à l'auramine :

Les bacilles apparaissent jaune-vert fluorescent sur un fond sombre (Ahogni, 2017).

Bactériologie :

La culture demeure l'étalon-or pour le diagnostic de tuberculose (Ninet et *al.*, 2011). La culture est plus sensible que la microscopie, elle est positive même avec moins de 100 bacilles par millilitre de prélèvement (Kent et Kubica, 1985 in M Toure, 2009).

Alors que la spécificité de la culture est considérée de 100%, sa sensibilité n'est pas parfaite et peut être influencée, entre autres, par la qualité du prélèvement (Schmitt, et *al.*, 1997).

La culture demeure la technique la plus sensible pour la détection de *M. tuberculosis* et par conséquent, c'est la méthode de référence pour les autres techniques (Maugein et Bébear, 2003).

Les prélèvements obtenus dans de bonnes conditions d'asepsie peuvent être mis en culture directement ou après une centrifugation de façon à concentrer les bactéries. Les prélèvements pouvant contenir des bactéries à croissance rapide vont subir une fluidification-décontamination afin d'homogénéiser les bactéries dans le produit et de se débarrasser les

bactéries gênantes. Les techniques traditionnelles de Petroff (soude à 4 %), de Tacquet et Tison (lauryl-sulfate et soude à 1 %) sont progressivement délaissées au profit de la technique de Kubica (Nacetyl-L-cystéine et soude) qui est mieux adaptée aux nouveaux milieux de culture (Kubica et *al.*, 1963 in Maugein et Bébéar, 2003 ; Pfyffer et *al.*, 1997 in Maugein et Bébéar, 2003). Depuis très longtemps, deux milieux solides à base d'œuf coagulé sont utilisés, à savoir : Löwenstein-Jensen et Coletsos (enrichi en pyruvate) (Maugein et Bébéar, 2003).

Identification :

L'identification préliminaire des cultures se base sur deux critères, à savoir : le délai d'apparition des colonies et leur pigmentation ; les colonies des bacilles tuberculeux ne se développent pas en culture primaire dans un délai inférieur à une semaine et prennent habituellement trois à quatre semaines pour donner une croissance visible. Les colonies sont de couleur chamois (jamais jaune) et d'aspect rugueux, ayant l'apparence de chou-fleur ou de chapelure (Narvaiz de Kantor et *al.*, 1998).

L'identification des espèces de mycobactéries était traditionnellement basée sur un ensemble de tests biochimiques et de caractéristiques phénotypiques (comme la pigmentation et le taux de croissance), qui permettent de classer une souche particulière dans un groupe de mycobactéries bien déterminées (Leao et *al.*, 2004).

L'identification biochimique se résume principalement en (Tableau 1) : la recherche d'acide nicotinique (niacine test), de nitrate réductase, d'uréase, catalase thermosensible, la croissance en présence de TCH (acide thiophène-2-carboxylique), la croissance sur PAS (acide paraamino-salicylique), de cyclosérine et pyrazinamide (Maugein et Bébéar, 2003).

Comparés aux résultats de PCR, la sensibilité et la spécificité de la croissance en présence de PNB pour l'identification du complexe *M. tuberculosis* étaient 97.8% et 100%, respectivement. La sensibilité de la croissance en présence de TCH était 100%. La spécificité est demeurée de dessous et plus d'études seront nécessaires (Cui et *al.*, 2011).

III-2.4.2. Diagnostic moléculaire :

La biologie moléculaire est un outil qui est largement utilisé pour la mise en évidence de la tuberculose, elle peut être réalisée directement sur des échantillons cliniques ou bien à partir des cultures (Ninet et *al.*, 2011). Les techniques moléculaires ont toutes pour point commun

d'améliorer la lutte contre la tuberculose et cela en réduisant le délai diagnostique et aussi la détection rapide de la résistance aux antituberculeux (Guillet-Caruba et *al.*, 2014).

III-2.4.3. Diagnostic histopathologique

Le diagnostic des infections mycobactériennes est généralement histologique et cela à cause des réactions observées au niveau des tissus et qui sont liées à la présence des mycobactéries. (Stevens et *al.*, 2002).

III-3. Traitement et prophylaxie

Le traitement de la tuberculose est réservé à l'espèce humaine (Bénet et *al.*, 2014). En France, le traitement de la tuberculose est interdit chez les ruminants domestiques, et il est fortement déconseillé chez les autres espèces animales et cela pour maintenir l'efficacité du peu de médicaments existants vis à vis la tuberculose humaine (ANSES, 2016).

La vaccination d'un animal contre la tuberculose est extrêmement dangereuse et donc la prophylaxie de la tuberculose animale est exclusivement sanitaire (Bénet et *al.*, 2016).

1 - Mesures défensives :

Elles visent à protéger les effectifs indemnes et de certifier leur qualité.

La surveillance aux frontières et la protection des étables indemnes en n'introduisant que des bovins venant de cheptels officiellement indemnes, maîtrise du risque de voisinage et celui de résurgence, et enfin la qualification sanitaire des troupeaux indemnes comme la vérification de l'état sanitaire des bêtes, inspection *post mortem* des animaux vendus pour la boucherie.

2 - Mesures offensives :

Elles sont basées sur le dépistage des élevages infectés, mesures de limitation comme l'interdiction des sorties d'animaux, assainissement de ces élevages reconnus infectés et enfin désinfection et repeuplement des étables avec des animaux provenant des élevages indemnes.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV : Enquête 1

Etude rétrospective de la tuberculose bovine dans cinq abattoirs en Algérie (Centre et Est).

IV-1. INTRODUCTION

La tuberculose bovine, causée par *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), est une maladie zoonotique, ré-émergente chez les animaux et les humains (El-Sayed et *al.*, 2016, Dumont, 2018). Elle pose de graves problèmes de santé publique et socio-économiques, notamment des pertes directes lors des saisies des viandes dans les abattoirs et des pertes en lait qu'elle entraîne. Aussi son impact sur le commerce international des animaux et de produits d'origine animale (Cousins, 2001 ; Bénet et *al.*, 2016).

C'est l'une des principales maladies à l'origine de pertes économiques évaluées à plusieurs dizaines de millions de dollars américains chaque année (Boukary et *al.*, 2011). La tuberculose humaine à *M. bovis* peut être contractée suite à la consommation de viande et de lait cru issus de bovins infectés (Ngandolo et *al.*, 2009).

En raison de son impact sur la santé animale et la santé publique, la tuberculose bovine est une maladie classée prioritaire et elle est donc contrôlée à l'interface animal-homme-écosystème, grâce à des efforts nationaux et régionaux (FAO, 2012).

Avec une moyenne estimée de 1,9 millions de têtes bovines durant la période 2010-2017 (M.A.D.R.P., 2018), l'Algérie est reconnue pour être infectée par la tuberculose à *M. bovis* (Sahraoui et *al.*, 2009). Malgré les efforts fournis et sa place en tant que maladie à déclaration obligatoire selon le décret exécutif du 1995 (Journal officiel, 1995) et malgré la mise en place d'un programme pluriannuel d'assainissement du bétail initié à la même année (Sahraoui et *al.*, 2008), des cas de tuberculose sont régulièrement rapportés dans les registres des abattoirs où cette maladie continue à causer des pertes de viande qu'elle occasionne lors des saisies. Aussi, la recherche de la tuberculose bovine repose uniquement sur le dépistage *ante mortem*

représenté par le test cutané ; l'intradermo-réaction à la tuberculine (IDR), et sur la recherche, en *post mortem*, des lésions suspectes à l'abattoir (Sahraoui et *al.*, 2011b).

Par ailleurs, en raison de nombreux facteurs, y compris les systèmes d'élevage extensifs, le mouvement des animaux et la disponibilité de la tuberculine, certains animaux ne sont jamais testés avec l'IDR au cours de leur vie. L'inspection des bovins dans les abattoirs, où chaque animal abattu subit une nécropsie et un contrôle lésionnel, est donc un élément essentiel du programme national d'assainissement du bétail. Cette inspection *post mortem* est une étape clé dans le diagnostic de la tuberculose vu l'inexistence de confirmation de laboratoire.

En se basant sur des cas rapportés dans les abattoirs, la présente étude a pour objectif d'apporter une meilleure compréhension de la situation actuelle de la tuberculose bovine en Algérie ; déterminer la prévalence et l'évolution de la maladie dans cinq abattoirs du pays, décrire les principales caractéristiques et établir un profil épidémiologique de cette maladie.

IV-2. Cadre de l'étude

IV-2.1. Lieu et période de l'étude

La présente étude consiste en une enquête rétrospective, à visée descriptive sur la tuberculose bovine dans cinq abattoirs du pays, à savoir l'abattoir de Bgayet, Souk Ahras, El-Harrach (wilaya d'Alger), Mouzaia (Blida wilaya) et l'abattoir de Médéa et au cours des six (06) années (du 1er janvier 2010 au 31 décembre 2015). La distance entre chaque abattoir a été estimée entre 36 km au minimum (Mouzaia – Médéa) et 585 km au maximum (Souk Ahras – Mouzaia) (**Figure 9**).

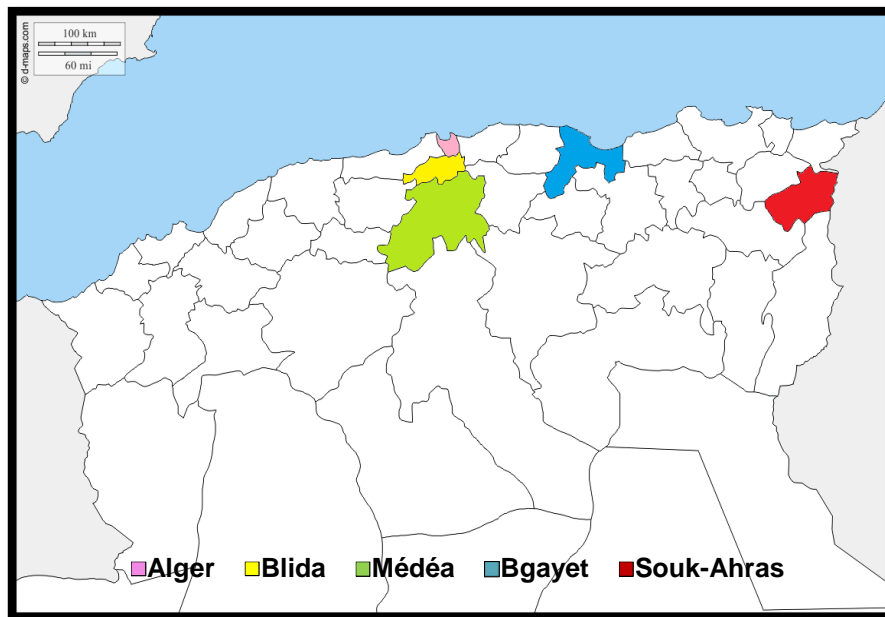


Figure 9: Localisation des cinq abattoirs

IV-2.2. Choix des abattoirs

Le choix de ces abattoirs a été justifié par :

- Leurs accessibilités et l'accord des vétérinaires des abattoirs ou les directeurs des services agricoles pour participer à cette étude.
- Leurs capacités d'abattage de bovins ; nous avons ciblé les abattoirs qui reçoivent un grand nombre de bovins.

IV-3. MATERIEL et METHODES

Comme notre étude a été menée dans cinq abattoirs, une consultation des registres d'abattage des cinq abattoirs a été réalisée. Les registres contenaient les espèces animales abattues, les maladies rencontrées et les saisies effectuées pendant la période d'étude.

Les bovins abattus dans ces abattoirs provenaient des régions limitrophes ou même des régions lointaines. Lorsque l'opération d'habillage est terminée, c'est au tour du vétérinaire inspecteur de procéder à l'inspection standard des carcasses et des abats. Cette inspection diffère d'un abattoir à un autre, mais elle consiste en une inspection, de loin puis de près, de la carcasse et une inspection des viscères. Cette dernière comprend l'examen visuel, la palpation et l'incision des organes et de leurs ganglions, principalement les poumons, le cœur, le foie et leurs ganglions ; médiastinaux, trachéo-bronchiques et hépatiques.

En cas de suspicion de tuberculose rencontrée principalement sur un et/ou tous les organes précédemment cités (fressure), le vétérinaire inspecteur effectue une inspection détaillée des autres organes (tels que le tube digestif) et de la carcasse entière (les cavités abdominale et thoracique) avec ses ganglions (pré-scapulaire, pré-crural etc.). Les organes présentant des lésions macroscopiques suspectes de tuberculose sont systématiquement saisis. Si le vétérinaire juge nécessaire qu'une partie (cuisse, épaule, autre) ou la totalité de la carcasse ne sera pas livrée à la consommation humaine ou animale pour cause de la tuberculose, il procède à une saisie partielle ou totale de la carcasse, qui est en fonction de la localisation de la lésion et de l'évolution de la maladie (tuberculose active ou stabilisée).

Les cas suspects de tuberculose sont définis comme toute lésion macroscopique suspecte de tuberculose, puis saisie lors de l'inspection des carcasses et viscères des bovins et mentionnée sur les rapports et/ou les registres des cinq abattoirs mentionnés ci-dessus.

La localisation de la tuberculose est classée selon le ou les organe(s) sur lequel/ lesquels une ou plusieurs lésions suspectes de tuberculose sont siégées (poumons, foie, tête). Sur le même bovin, un, deux, ou plusieurs voire tous les organes peuvent être atteints.

L'évolution de la tuberculose est définie comme l'incidence des cas de tuberculose découverts chaque année dans les cinq abattoirs. L'étude de l'effet du changement de la saison sur l'apparition de la tuberculose était basée sur les incidences mensuelles de lésions suspectes au niveau des cinq abattoirs entre 2010 et 2015.

Analyses statistiques

Une étude statistique descriptive a été réalisée sur les données. Pour comparer les fréquences des différentes variables, le test Chi2 a été utilisé à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System).

Les présentations graphiques ont été effectuées à l'aide de Microsoft Office Excel 2013.

IV-4. RESULTATS

IV-4.1. La consommation de viande bovine

Au total, 116619 bovins ont été abattus dans les cinq abattoirs entre 2010 et 2015 (allant de 5530 à 75672 par abattoir). Il paraît que la consommation de la viande est maximale pendant la période estivale (33,832 têtes), surtout au mois de juillet (12273 têtes), il y a un effet significatif ($p = 0,037$) de la saison sur le nombre de bovins abattus. Cette demande en viande a atteint son minimum en mois de novembre avec 7957 têtes (**Figure 10**).

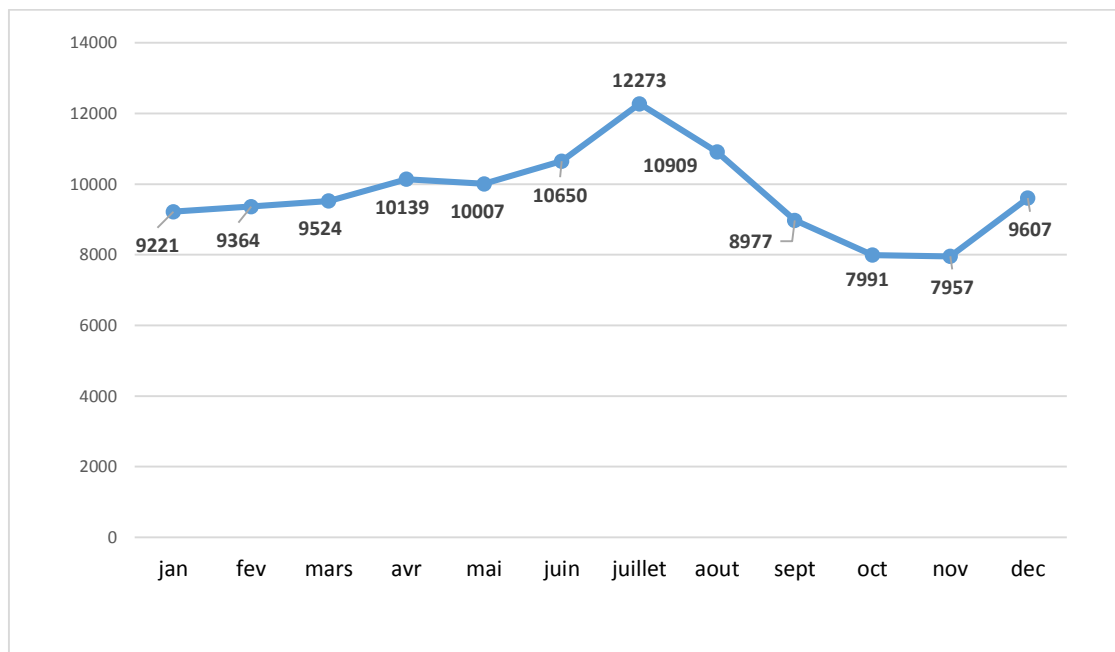


Figure 10 : Effectifs mensuels de bovins abattus dans les cinq abattoirs, 2010-2015

Cette demande a enregistré une différence très significative ($p = 0,0004$) entre les six années, elle a nettement évolué entre 2010 (16130 têtes) et 2015 (22019 têtes), avec une légère baisse de la demande en 2013 et en 2014, avec 18980 têtes et 18456 têtes respectivement (**Figure 11**).

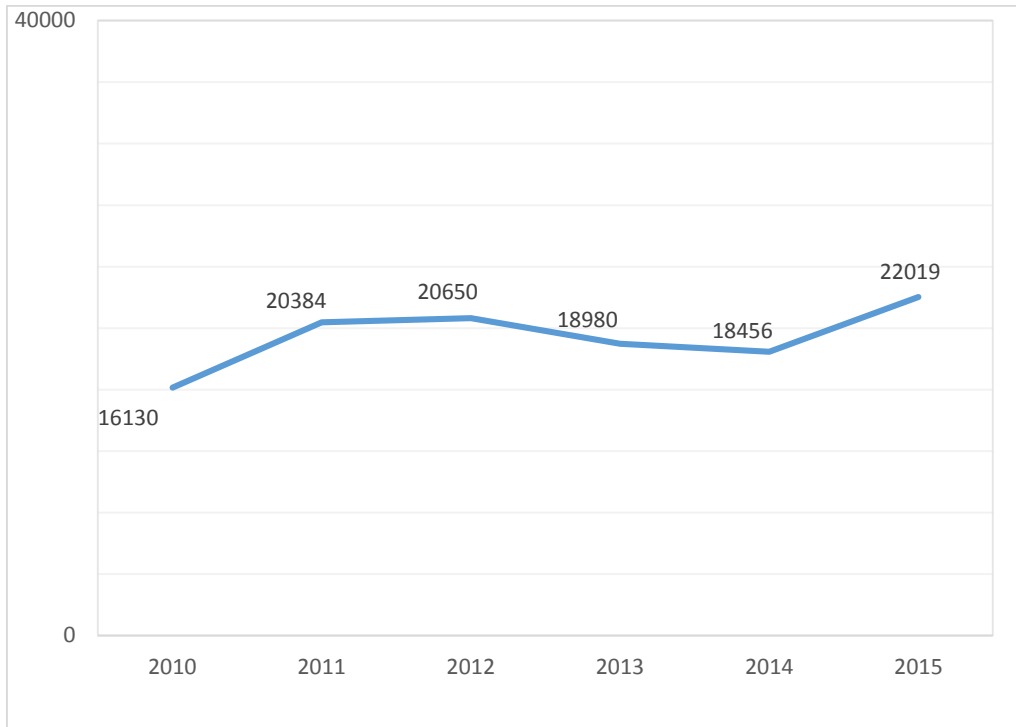


Figure 11 : Effectif de bovins abattus entre 2010 et 2015

IV-4.2. Effectif abattu par abattoir

En ce qui concerne le nombre de bovins abattus, une différence très significative ($p < 0.0001$) entre les cinq abattoirs a été constatée ; l'abattoir d'El Harrach, qui a reçu 75672 bovins, est classé premier, recevant en moyenne 1051 têtes par mois. Un total de 5530 bovins abattus à l'abattoir de Mouzaia, représente le nombre le plus faible parmi les cinq abattoirs (**Figure 12**). Dans les cinq abattoirs et pendant les six ans, le nombre moyen de bovins abattus par mois est de 1619 bovins, la moyenne mensuelle par abattoir est de 323 bovins.

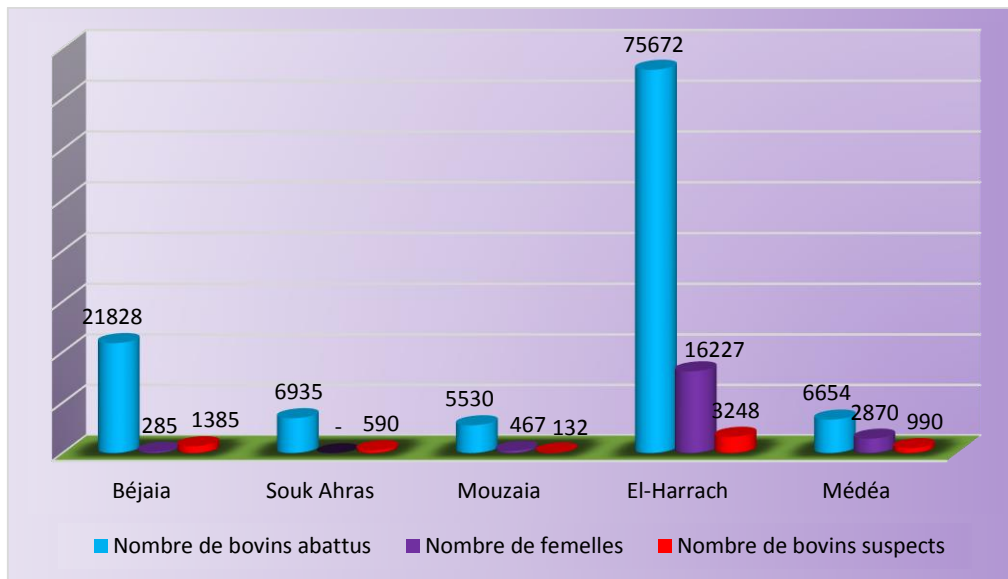


Figure 12 : Effectif de bovins abattus et suspects dans les cinq abattoirs, entre 2010 et 2015

IV-4.3. Abattage des femelles

Le nombre de femelles est nettement inférieur à celui des mâles ; 285 vs 21543 à l'abattoir de Bgayet, 467 vs 5063 à Mouzaia, 16227 vs 59445 à El-Harrach et 2870 vs 3784 à Médéa (Tableau 2).

Tableau 2 : Nombre et prévalence des femelles abattues

Abattoirs	Nombre de bovins abattus	Nombre de femelles abattues	%	<i>P- value</i>
Bgayet	21828	285	1.3	$p < 0.0001$
Souk Ahras*	6935	-	-	-
Mouzaia	5530	467	8.44	$p < 0.0001$
El-Harrach	75672	16227	21.4	$p < 0.0001$
Médéa	6654	2870	43.13	$p < 0.0001$

*Le nombre de femelles abattues à l'abattoir de Souk Ahras n'a pas été mentionné sur les rapports consultés.

Dans quatre abattoirs, nous avons constaté que le nombre de mâles est très significativement ($p < 0,0001$) supérieur à celui des femelles.

IV-4.4. Détermination de la prévalence des lésions macroscopiques suspectes de tuberculose bovine

Dans les cinq abattoirs et durant les six (6) années indiquées ci-dessus, un total de 116619 carcasses bovines a été inspecté, dont 6345 présentant des lésions visibles suspectes de tuberculose (**Tableau 3**), soit une proportion de 5,44%.

Tableau 3 : Nombre et prévalence des cas suspects de tuberculose bovine

Abattoirs	Nombre de bovins abattus	Nombre de bovins suspects	Prévalence (%)
Bgayet	21828	1385	6,34
Souk Ahras	6935	590	8,5
Mouzaia	5530	132	2,38
El-Harrach	75672	3248	4,29
Médéa	6654	990	14,87
Total	116619	6345	5,44

Au cours des six années, 75672 bovins ont été abattus à l'abattoir d'El-Harrach. Néanmoins, la forte prévalence des cas suspects est enregistrée à l'abattoir de Médéa (14,87%) suivi de celui de Souk-Ahras avec 8,5%. La tuberculose est rare à l'abattoir de Mouzaia (2,38%). Cette différence dans le nombre de bovins suspects enregistrés dans les différents abattoirs est hautement significative ($p < 0,0001$). Par contre, l'abattoir de Médéa enregistre l'incidence maximale, par mois, qui était de 29,84%. La suspicion mensuelle moyenne, dans tous les abattoirs, est de 6,85%. Pendant toute la période d'étude et dans les cinq abattoirs, le nombre mensuel maximal de carcasses suspectes de tuberculose était de 98 cas, enregistré à l'abattoir d'El-Harrach en mois de mai de l'année 2015.

IV-4.5. Distribution des lésions suspectes de tuberculeuses sur les organes

Au cours de la période d'étude, 8916 organes étaient porteurs de lésions tuberculeuses et donc saisis, la majorité de ces lésions ont été détectées sur le l'appareil respiratoire (poumons et ganglions lymphatiques pulmonaires) ($n = 6272$; 70,34%), sur le foie ($n = 1540$; 17,27%) et sur la tête ($n = 853$; 9,56%). Les autres organes touchés étaient le tractus gastro-intestinal ($n = 167$; 1,87%), la rate ($n = 69$; 0,77%), les reins ($n = 8$; 0,09%), les testicules ($n = 4$; 0,044%) et la mamelle ($n = 3$; 0,033%). Un poids de 69.731 kg de viande a été saisi (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Répartition des lésions suspectes de tuberculose

Organe touché et saisi	Nombre d'organes touchés et saisis	Pourcentage (%)
Poumons-Cœur	6272	70,34
Foie	1540	17,27
Tête	853	9,57
Tractus gastro-intestinal	167	1,87
Rate	69	0,77
Reins	8	0,09
Mamelle	3	0,034
Testicules	4	0,045
Total	8916	100
Viande (Kg)	69731	-

Les résultats de la distribution des lésions sur les organes sont illustrés dans la figure suivante (**Figure 13**).

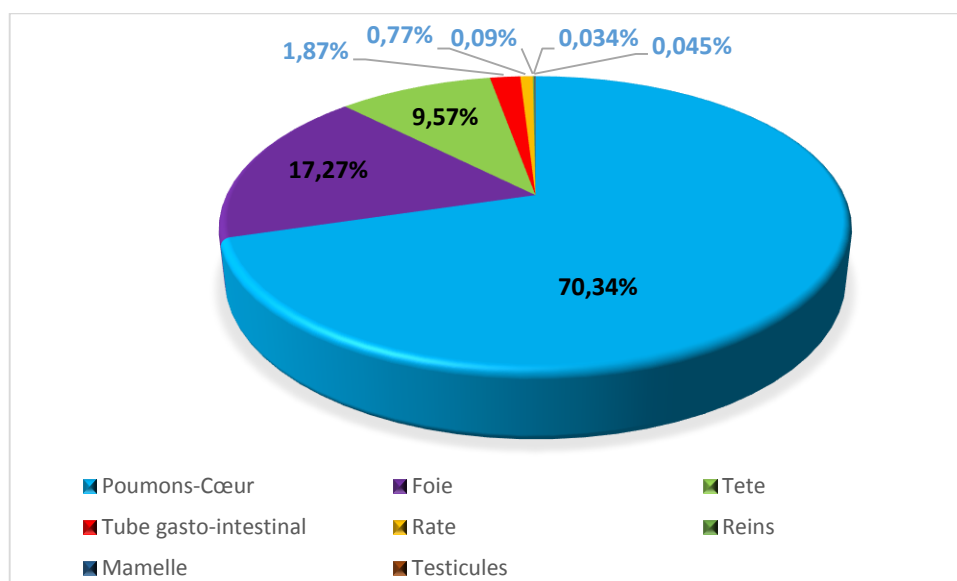


Figure 13 : Localisation des lésions suspectes de tuberculose

IV-4.6. Evolution de la tuberculose dans cinq abattoirs

Entre 2010 et 2015, l'incidence des cas de tuberculose ne cesse d'augmenter ($p < 0,0001$), avec une montée remarquable à partir de 2014. L'incidence minimale est observée en 2010 (4,01%), et l'incidence maximale (7,72%) est enregistrée en 2015. Cette évolution connaît une stabilité (plateau) entre 2012 (4,89%) et 2013 (4,9%) (**Figure 14**).

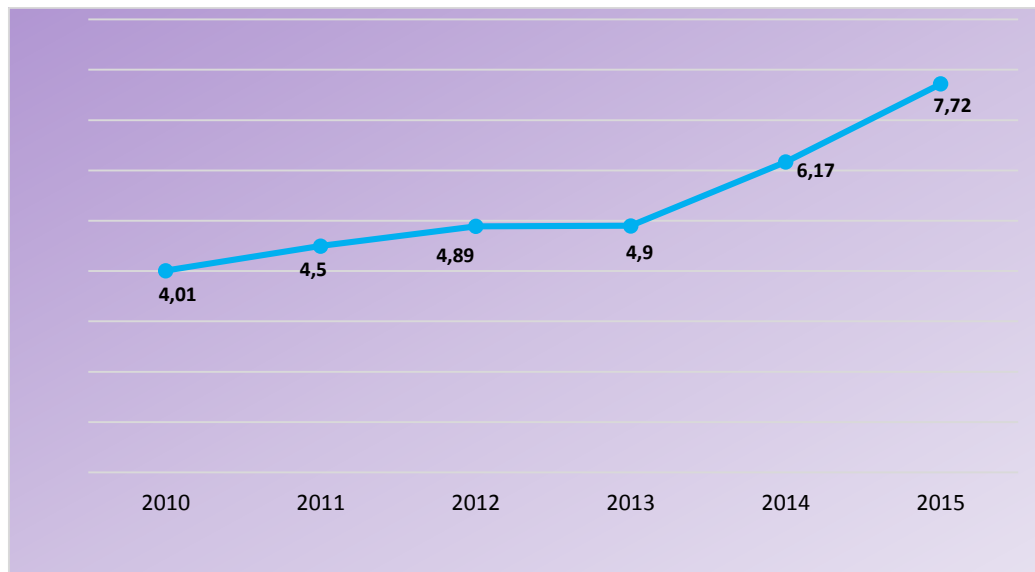


Figure 14 : incidence des cas de tuberculose entre 2010 et 2015

IV-4.7. Effet de la saison sur la découverte de lésions

Nous constatons que l'incidence mensuelle minimale est enregistrée pendant la période d'été, avec 4,78% et 4,73% en juillet et août, respectivement (**Figure 15**). Néanmoins, nous avons déjà signalé que pendant ces deux mois, le nombre de bovins abattus a atteint son maximum avec 12273 et 10909 têtes en juillet et août respectivement ; la saison n'a pas d'effet significatif ($p = 0,8818$) sur le pourcentage de cas de tuberculose. De plus, la différence du nombre de cas de tuberculose enregistrés entre les mois de l'année n'est pas significative ($p = 0,6972$).

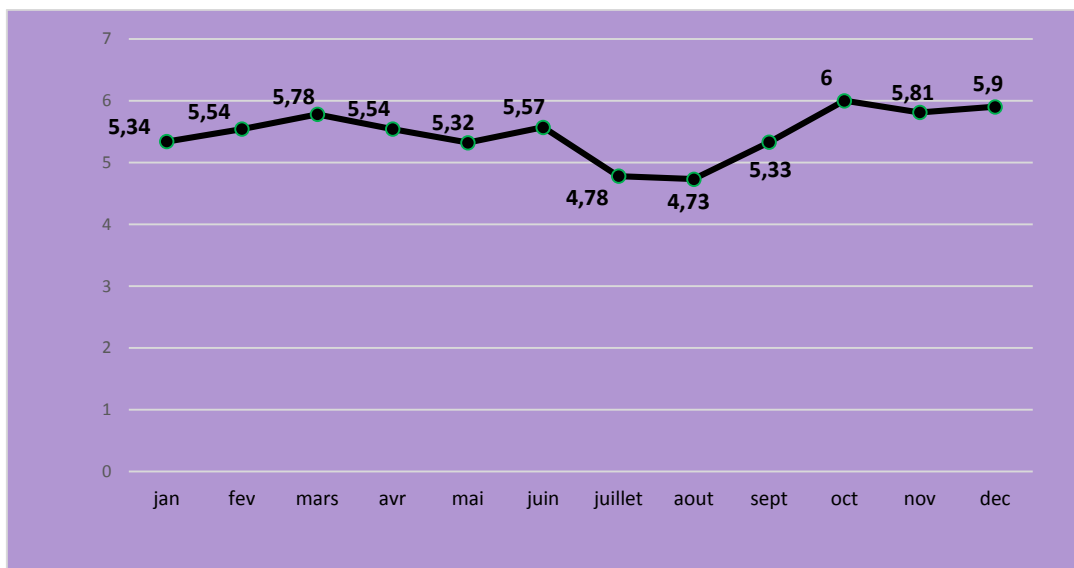


Figure 15 : Incidence mensuelle des lésions suspectes de tuberculose dans les cinq abattoirs, 2010-2015

IV-5. DISCUSSION

Nous tenons à souligner que les conditions de travail dans certains abattoirs ne sont pas parfaites et la démarche de l'inspection suivie pour la recherche d'anomalies et de lésions, notamment celles de la tuberculose, diffère d'un abattoir à l'autre.

La consommation de viande bovine

En Algérie, la viande rouge est essentiellement constituée de viande bovine, ovine et caprine. La préférence d'un type de viande sur un autre varie selon les régions, les traditions et aussi le coût. La production nationale de viande bovine est classée en deuxième après la viande ovine (Nedjraoui, 2003 in Sadoud, 2019).

Pendant la période d'étude, le nombre de bovins abattus est significativement ($p=0,03695$) plus élevé en été, cela correspond aux fêtes de mariage qui s'organisent très souvent en été, et il faut aussi prendre en considération que, ces dernières années, l'été coïncide avec le mois de Ramadhan où la consommation de viande augmente en raison des habitudes culinaires du pays. L'abattoir d'El-Harrach reçoit le plus grand nombre ($p < 0,0001$) de bovins (1.051 têtes par mois), cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il est situé dans la capitale, Alger, qui est classée première wilaya d'Algérie en termes de population.

Dans quatre abattoirs, à savoir les abattoirs de Bgayet, Mouzaia, El-Harrach et l'abattoir de Médéa, nous avons constaté que le nombre de mâles est significativement ($p < 0,0001$) supérieur à celui des femelles. Cela pourrait être expliqué par la demande du marché ; le consommateur a une préférence pour la viande du veau ou du taureau plutôt que la viande de vache. Cette différence pourrait également être expliquée par le fait que la réglementation algérienne interdit l'abattage des femelles autrement qu'en cas de nécessité, comme en cas de la réforme, lors d'un abattage d'urgence ou abattage sanitaire.

Prévalence des lésions macroscopiques suspectes de tuberculose bovine

Il convient de noter qu'en Algérie le dépistage lésionnel de la tuberculose animale est, principalement, pratiquée sur l'espèce bovine et il se limite à l'IDR et aux inspections de viandes dans les abattoirs. La confirmation de la maladie dans des laboratoires n'existe pas. Les données sur les autres espèces domestiques sont rares voire inexistantes.

De plus, les informations obtenues à partir des registres sont très limitées. Les informations concernant les animaux abattus (comme l'âge, la race) et notamment leur origine et leurs mouvements ne sont pas mentionnées, ce qui limite la possibilité de réaliser une étude épidémiologique spatiale sur la répartition de la tuberculose bovine.

De plus, l'existence de l'abattage clandestin rend la découverte et le recensement des cas de tuberculose difficiles voire impossibles et par conséquent la viande infectée sera livrée à la consommation humaine.

Nous rapportons ici l'évolution et les principales caractéristiques de la tuberculose bovine à partir des cas notifiés sur les rapports mensuels des DSA et/ou les registres de cinq abattoirs et sur une période de six ans. Bien que cette enquête ne couvre pas l'ensemble du pays, elle donne un aperçu contributif de la situation de la maladie en Algérie.

Nos résultats ont montré la présence (5,44%) de cas de tuberculose bovine dans tous les abattoirs mentionnés ci-dessus. La prévalence la plus élevée (14,87%) et la plus faible (2,38%) des cas suspects sont enregistrées respectivement à l'abattoir de Médéa et de Mouzaia. Cette différence ($p < 0,0001$) entre les abattoirs est considérable. Aussi, cette faible prévalence enregistrée à l'abattoir de Mouzaia pourrait être due au nombre de bovins abattus (5530 têtes) dans cet abattoir, qui représente le nombre le plus faible parmi les cinq abattoirs. De plus, dans cet abattoir, nous avons même remarqué que durant plusieurs mois, la tuberculose n'a jamais été rapportée.

Ce pourcentage (5,44%) ne reflète pas la prévalence réelle de la tuberculose car, comme le rapportent Thorel *et al.* (2003), la tuberculose bovine peut être confondue avec certaines maladies fréquentes chez cette espèce, à savoir ; actinobacillose et actinomycose (lymphatique, pulmonaire ou osseuse), adénopathie hépatique et splénique de la leucose lymphoïde, adénite banale, brucellose génitale (endométrite, orchite) et quelques tumeurs des séreuses.

De plus, l'inspection *post mortem*, réalisée dans les abattoirs, varie légèrement d'un pays à l'autre. Toutefois, la sensibilité de cette inspection est difficile à évaluer avec précision (Sieng, 2011). L'efficacité de l'inspection *post mortem* est essentiellement influencée par l'éclairage

de l'abattoir, la vitesse de la chaîne d'abattage et l'expérience du vétérinaire inspecteur (Moore et Good, 2006, Frankena et al., 2007, Sieng, 2011).

Asseged et ses collaborateurs (2004), indiquent que l'inspection des viandes à l'abattoir ne permet de détecter que 55 % des cas de tuberculose bovine chez des animaux infectés et présentant des lésions visibles. Des études visant d'évaluer la sensibilité de l'inspection de routine (standard) par rapport à l'inspection détaillée pour la détection des lésions tuberculeuses chez les bovins et les blaireaux réalisées, respectivement, en Australie et en Angleterre. La première a montré que 47% des lésions ne sont pas détectées lors de l'inspection de routine. La deuxième, a révélé que cette sensibilité n'est que de 54,6% (Corner et al., 1990 ; Crawshaw et al., 2008). En Ethiopie, l'examen détaillé de laboratoire, réalisé dans le but de détecter les lésions tuberculeuses, a révélé que l'inspection de routine à l'abattoir n'a permis de détecter que 29,4 % des carcasses ayant des lésions visibles (Teklu et al., 2004).

Cela pourrait être expliqué par la nature des infections à mycobactéries où les animaux récemment infectés ou porteurs latents ne contiennent probablement qu'un petit nombre de bactéries dans un nombre limité de tissus ou d'organes et par conséquent, à l'inspection, ces animaux ne présentant que des lésions microscopiques (Crawshaw et al., 2008). Aussi, les animaux qui ne présentent aucune lésion macroscopique suspecte de tuberculose, en *post-mortem*, peuvent également être infectés par *M. bovis* (Whipple et al., 1996). En conséquence, *M. bovis* peut échapper à l'inspection et la viande et / ou les organes infectés seront livrés à la consommation humaine. Dans ce cas, la contamination humaine pourrait être causée par l'ingestion de produits animaux infectés par *M. bovis*.

Par ailleurs, les lésions suspectes de tuberculose peuvent ne pas contenir *M. bovis* ou *M. caprae*, mais plutôt d'autres mycobactéries non tuberculeuses (MNT).

Une étude réalisée en Ouganda montre que sur 61 lésions suspectes de tuberculose colletées puis cultivées, des MNT ont été trouvées dans 18 (48,6%) parmi les 37 échantillons où des mycobactéries ont été détectées (Oloya et al., 2007).

Une autre étude réalisée au Kenya où 218 lésions suspectes de tuberculose, des BAAR ont été observés dans 63/218 frottis et des mycobactéries ont été isolées dans 35 d'entre elles. Parmi lesquelles 32 (91,4%) sont MNT (Kuria et al., 2018).

Cette prévalence apparente (5,44%) est comparable à celles précédemment enregistrées en Algérie (3,58%) et au Maroc (3,7%) (Sahraoui et *al.*, 2011b, Yahyaoui-Azami et *al.*, 2017). En Tunisie, sur 100 bovins, 48 réagissaient positivement au test de l'IDR ou étaient porteurs de lésions tuberculeuses suspectes lors de l'inspection *post mortem* (Lamine-Khemiri et *al.*, 2014). En Égypte, sur 34 bovins ayant réagi au test cutané puis abattus, 23 avaient des lésions tuberculeuses (Abdellrazeq et *al.*, 2014).

Cette prévalence varie en Afrique centrale entre 0,18% au Cameroun, 8% en RD Congo et 11,86% au Tchad (Awah-Ndukum et *al.*, 2010, Mposhy et *al.*, 1983, Ngandolo et *al.*, 2009). En Afrique de l'Ouest, elle est de 0,0185% au Sénégal, qui représente la prévalence la plus faible dans tout le continent, 0,19% au Niger, 1% au Mali, 4,05% au Nigeria et 4,4% au Côte d'Ivoire (Dao, 2005, Müller et *al.*, 2008, Aliyu et *al.*, 2009, Diagne 2009, Boukary et *al.*, 2012, Cisse et *al.*, 2008). En Afrique de l'Est, cette prévalence est de 1,43% au Soudan, 4,5% en Éthiopie et 18,95% au Kenya (Aljameel et *al.*, 2014, Teklu et *al.*, 2004, Gathogo et *al.*, 2012). Cependant, à l'abattoir de Djibouti et sur 1.500 carcasses de bovins, aucune lésion macroscopique de tuberculose n'a été observée (Chantal et *al.*, 1994).

La localisation des lésions

A l'inspection des carcasses, il ressort que les lésions suspectes de tuberculose sont principalement localisées au niveau de l'appareil respiratoire (poumons et leurs ganglions lymphatiques) avec un taux de 70,34%, suivies de l'atteinte hépatique (17,27%). La fressure, constituée de poumons, cœur et foie, et de ses ganglions constituent les premiers et surtout les principaux organes inspectés par les vétérinaires des abattoirs pour la recherche de lésions, notamment les lésions de tuberculose. Par conséquent, une lésion siégeant en dehors de la fressure peut ne pas être détectée et passer inaperçue.

Cette prédominance respiratoire pourrait également être expliquée par le mode de transmission de la maladie qui est fréquemment aérien, affectant essentiellement le système respiratoire (Serrano et *al.*, 2018). Ce mode de transmission est assuré par l'inhalation d'aérosols contenant *M. bovis* passant immédiatement d'un animal excréteur à un autre sain (Yahyaoui-Azami et *al.*, 2017). Cette hypothèse rejoint ce qui est rapporté par Müller et *al.* (2008), qui ont conclu que la présence de lésions pulmonaires était étroitement associée à l'infection à *M. bovis*.

En Afrique, plusieurs auteurs (Teklu et *al.*, 2004, sahraoui et *al.*, 2011b; Boukary et *al.*, 2012; Kuria et *al.*, 2018) rapportent que des lésions tuberculeuses avec localisation respiratoire (poumon et/ou ganglions lymphatiques thoraciques) sont prédominantes.

Le foie constitue, dans notre étude, le deuxième (17,27%) organe saisi pour tuberculose. Certains auteurs considèrent que la localisation du complexe primaire dans le foie et / ou ses ganglions lymphatiques résulte d'une transmission transplacentaire de bacilles au fœtus liée à une éventuelle endométrite tuberculeuse (Domingo et *al.*, 2014).

Nous avons également rencontré des lésions tuberculeuses sur la tête (9,56%). Les ganglions lymphatiques de cette dernière sont généralement atteints suite à une inhalation et / ou ingestion de *M.bovis* (aérienne et / ou orale). Dans les deux voies de transmission, les amygdales constituent l'un des premiers sites de développement de l'infection. par conséquent, les ganglions lymphatiques rétropharyngiens, suite à un drainage lymphatique, seront affectés (Fitzgerald et *al.*, 2016).

L'atteinte digestive peut être à l'origine d'une contamination orale suite à l'ingestion de *M. bovis*. Cette ingestion peut survenir lors du partage de points d'eau et / ou de l'alimentation (Barasona et *al.*, 2016, Cowie et *al.*, 2016).

La rareté (1,87%) des lésions tuberculeuses sur le tube digestif et / ou sur ses ganglions pourrait s'expliquer, d'une part, par le fait que les lésions peuvent passer inaperçues car le tube digestif, dans certains abattoirs, n'est pas minutieusement inspecté comme la fressure et la tête, d'une autre part les lésions digestives semblent mettre plus de temps, après infection, pour apparaître par rapport aux lésions du l'appareil respiratoire (Serrano et *al.*, 2018).

La rareté de lésions du tractus gastro-intestinal (n = 167 ; 1,87%), de la rate (n = 69 ; 0,77%), des reins (n = 8 ; 0,09%), des testicules (n = 4 ; 0,044%) et de la mamelle (n = 3 ; 0,033%) pourrait être expliquée par le fait que pas tous les abattoirs qui mentionnent sur leurs registres l'atteinte et la saisie de ces organes, la plus part ne mentionne que l'atteinte des poumons, du foie et de la tête.

Evolution de la tuberculose dans cinq abattoirs

L'incidence minimale et maximale sont observées en 2010 et 2015, avec respectivement 4,01% et 7,72%. L'incidence des cas de tuberculose ne cesse d'augmenter ($p < 0,0001$) durant cette période avec une montée remarquable à partir de l'année 2014 (6,17%) (Fig. 14). Cela pourrait être expliqué par l'épizootie de fièvre aphteuse qui a frappé l'Algérie en été 2014 (Bouguedour et Ripani, 2016). Car comme indiqué par Rouse et Sehwat (2010) certains virus ont généralement une ou plusieurs propriétés qui leur permettent de réduire l'efficacité de l'immunité de l'hôte. Cette fragilisation participe fréquemment à la perpétuité des infections chroniques (Virgin et al., 2009), comme l'infection tuberculeuse, où *M. bovis*, comme *M. tuberculosis*, pourrait rester en dormance (phase de latence) pendant des années, mais il pourrait être réactivé lorsque l'immunité de l'hôte décline (Lim et al., 1999; Chavez-Galan et al., 2016). De plus, cette forte prévalence (7,72%) enregistrée en 2015 pourrait être liée au nombre de bovins abattus au cours de cette année, où il atteignait un chiffre record de 22019 bovins, donc les chances de trouver des lésions tuberculeuses sont grandes. De plus, cette augmentation des taux de découverte des animaux porteurs de lésions à l'abattoir pourrait être expliquée par des défaillances dans les tests d'IDR (McKinley et al., 2018).

Effet de la saison sur la découverte de lésions

Le nombre de bovins abattus atteint son maximum en été, notamment en mois de juillet et août avec respectivement 12273 et 10909 têtes. Néanmoins, l'incidence mensuelle minimale de la tuberculose est enregistrée pendant cette période, avec 4,78% au mois de juillet et 4,73% au mois d'août (Fig. 3). Cela pourrait être expliqué par la vitesse de la chaîne d'abattage qui est accélérée vu le nombre important de bovins destinés à l'abattage durant cette période. Par conséquent, de minuscules lésions, siégeant sur certains organes, échappent à l'inspection, ou vétérinaire inspecteur serait dépassé pour effectuer une inspection approfondie de tous les organes et de la carcasse.

La prévalence apparente des lésions tuberculeuses dans les cinq abattoirs n'est pas influencée par la saison ($p = 0,8818$). Le même constat a été fait par certains auteurs (Nwanta et al., 2011, Ejeh et al., 2014, Youssef et Ahmed, 2014). Cependant, d'autres rapportent que l'apparition des lésions tuberculeuses est influencée par la saison (Boukary et al., 2012, Moore et Good, 2006, Ejeh et al., 2013 et Okeke et al., 2016).

CONCLUSION

L'inspection *post-mortem* des viandes à l'abattoir est un moyen de contrôle de routine de plusieurs maladies zoonotiques notamment la tuberculose. Il assure donc la salubrité de la viande avant sa livraison à la consommation humaine ou animale. Néanmoins, l'inspection de routine, pratiquée dans les abattoirs pour la recherche des lésions causées par *M. bovis*, peut manquer de sensibilité et donc elle ne suffit pas. Une inspection approfondie et détaillée de tous les organes et de la carcasse avec leurs ganglions lymphatiques, et surtout une confirmation de laboratoire sont recommandées.

La forme respiratoire est la forme clinique la plus courante de tuberculose bovine (70,34%), indiquant la forte concentration de *M. bovis* dans l'appareil respiratoire qui pourrait être à l'origine d'une contamination humaine, soit par inhalation d'aérosols, soit par contact avec des sécrétions nasales de bovins (Pollock et Neill 2002, Moreira et *al.*, 2019). Cette transmission pourrait conduire à une tuberculose zoonotique chez l'homme. Cette dernière ne peut être distinguée cliniquement ou pathologiquement de la tuberculose due à *M. tuberculosis* (de la Rua-Domenech, 2006a). La forme mammaire est rare (0,033%), mais son existence serait une voie de contamination pour l'homme par la consommation de lait cru infecté.

En termes de pertes économiques directes, nous avons rapporté qu'un total de 8916 organes et un poids de 69731 kg de viande ont été saisis, illustrant l'effet dévastateur de la tuberculose bovine sur la rentabilité des exploitations.

Cette augmentation, sans cesse, d'incidence doit être une source de préoccupation pour les décideurs, car elle peut aussi bien témoigner une défaillance de l'IDR, soit en son efficacité, sa fréquence ou encore en sa disponibilité.

L'augmentation de la tuberculose bovine en Algérie est comparable à celle de la tuberculose humaine à localisation extra-pulmonaire. Selon M.S.P.R.H, son incidence est passée de 31,4 cas à 36,1 cas pour 100 000 habitants en 2006 et 2016 respectivement (une augmentation de 15%). Selon la même source, la tuberculose extra-pulmonaire avec localisation péritonéale se classe troisième (6,4%) après l'atteinte ganglionnaire et pleurale (Alihalassa, 2017). De même, Torres-Gonzalez et *al.* (2016) rapportent que la localisation extra-pulmonaire de la tuberculose humaine est liée à la présence de *M. bovis* et plus particulièrement à l'atteinte

digestive dans 32,8% des cas, contre 10,7% pour *M. tuberculosis* chez les patients atteints de tuberculose extra-pulmonaire. Des études complémentaires doivent être menées pour rechercher l'origine de cette atteinte digestive qui pourrait résulter d'une dissémination du bacille à partir d'un autre site dit foyer primaire (ex. foyer pulmonaire), ou bien suite à l'ingestion de produits d'origine animale infectés par *M. bovis*.

CHAPITRE V : Enquête 2

Analyse de la séquence du génome entier des isolats de bovins de *Mycobacterium bovis*, centre Algérien.

V-1. INTRODUCTION

La tuberculose bovine est une infection chronique et mortelle le plus souvent causée par *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) et *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*), deux espèces appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Lorente-Leal et al., 2019 ; Eroksuz et al., 2019). *M. bovis* infecte le plus souvent les bovins mais provoque également la tuberculose chez d'autres espèces animales et est une cause ré-émergente de tuberculose zoonotique chez l'homme (Nebreda-Mayoral et al., 2019 ; Belkhiri et al., 2009). Cette maladie constitue une menace majeure pour la santé publique et crée des problèmes socio-économiques, notamment la perte de viande due aux saisies dans les abattoirs et la baisse des rendements laitiers (Boland et al., 2010 ; Cousins, 2001). En conséquence, la tuberculose bovine a un impact sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale (Cousins, 2001 ; Amanfu, 2006), et la tuberculose bovine doit être notifiée à l'Organisation mondiale de la santé animale, comme mentionné dans son code sanitaire pour les animaux terrestres (World Organisation for Animal Health, 2020).

En Algérie, certaines des 2 049 652 têtes de bétail (M.A.D.R.P., 2015) du pays sont suspectées d'être infectées par *M. bovis* (Sahraoui et al., 2009). Les cas de tuberculose bovine sont souvent signalés dans les registres des abattoirs, et les travailleurs des abattoirs sont exposés à l'infection transmise par aérosol contenant *M. bovis* provenant des bovins (Michel et al., 2010). En Algérie, le dépistage cutané ante mortem à la tuberculine et les examens *post mortem* des lésions suspectes à l'abattoir sont les procédures officielles de diagnostic de la maladie (Sahraoui et al., 2011b). Néanmoins, en l'absence de diagnostic biologique systématique, la confirmation définitive de la maladie fait défaut. Par conséquent, la tuberculose bovine reste une maladie infectieuse négligée en Algérie, et peu d'études microbiologiques ont été rapportées (Sahraoui et al., 2009). L'identification de la circulation des souches de *M. bovis* et de leurs hôtes et leur répartition géographique sont mal comprises.

Cette étude visait à commencer à combler cette lacune, en utilisant le séquençage du génome entier (WGS) pour étudier quelques souches de *M. bovis* circulant actuellement en Algérie.

La présente étude consiste en une enquête prospective, à visée descriptive sur la recherche des cas suspects de la tuberculose, la mise en évidence des agents responsables de cette affection sur des carcasses de bovins et estimer la diversité génétique des souches de *M. bovis* actuellement en circulation en Algérie en utilisant la caractérisation basée sur la séquence du génome entier d'isolats de *M. bovis* dans cinq abattoirs en Algérie.

V-2. Cadre de l'étude

La présente étude est une enquête prospective, elle a été réalisée au niveau de cinq abattoirs et les prélèvements ont été traités dans deux laboratoires.

V-2.1. Lieu et période de l'étude

V-2.1.1. Abattoirs

L'étude a été menée à différentes périodes de 2017 et 2018 dans cinq abattoirs en Algérie ; à savoir l'abattoir de Bgayet (janvier-mai 2018), Sétif (janvier-mai 2018), Médéa (décembre 2016-avril 2017), Mouzaia (mars-mai 2017) et l'abattoir de Boufarik (mars-mai 2018), ces deux derniers sont situés dans le département de Blida. La distance entre ces abattoirs a été estimée entre 27 km au minimum (Mouzaia – Boufarik) et 315 km au maximum (Sétif – Mouzaia) (**Figure 16**).

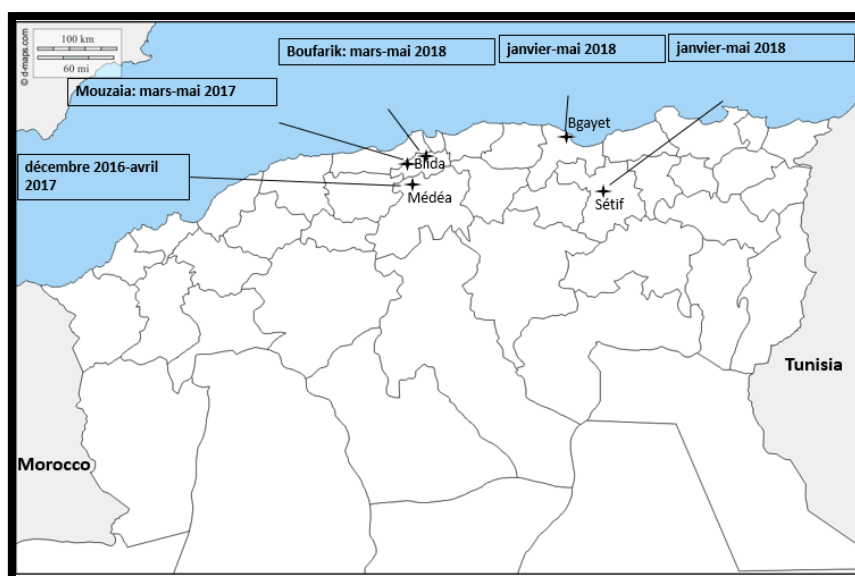


Figure 16 : Distribution des cinq abattoirs situés dans quatre départements du nord de l'Algérie.

✓ **Choix des abattoirs**

Le choix de ces abattoirs, travaillant six jours sur sept, a été justifié par :

- ✓ Leur accessibilité,
- ✓ La participation des étudiants, de ces régions, qui préparaient leurs projets de fin d'étude.
- ✓ Leurs capacités d'abattage de bovins ; nous avons ciblé les abattoirs qui reçoivent un grand nombre de bovins.

Les bovins abattus dans ces abattoirs provenaient des régions voisines ou parfois des lointaines. Une fiche d'information a été systématiquement établie pour chaque animal abattu, indiquant le sexe, l'âge, la race, l'état d'embonpoint et l'origine de l'animal. Au cours de la période d'étude, des lésions suspectes de tuberculose ont été collectées sur des bovins abattus et conservées à -20 ° C pendant quelques jours pour les prélèvements réalisés en 2016-2017 et pendant 11 à 15 mois pour ceux réalisés en 2018 pour un traitement ultérieur au niveau du laboratoire.

V-2.1.2. Laboratoires

Les échantillons collectés ont été traités à Institut Pasteur d'Algérie (annexe d'El Hamma - Alger) et à l'Institut Hospitalier Universitaire, Méditerranée Infection de Marseille (France).

V-3. MATERIEL et METHODES

V-3.1. Matériel

Nous avons utilisé le matériel suivant :

V-3.1.1. Au niveau des abattoirs

✓ **Matériel biologique (Animaux)**

Au niveau des abattoirs, nous avons accompagné le vétérinaire lors de l'inspection des viscères et des carcasses des bovins qui y sont parvenus. Ces animaux provenaient des élevages agréés ou non agréés et les données de leur provenance n'étaient pas toujours disponibles.

Population d'étude

L'étude a porté sur la population des bovins abattus dans les abattoirs et durant les périodes d'étude précédemment cités et en présence de l'enquêteur.

✓ Matériel non biologique

Pour ce faire, nous avons utilisé le matériel de récolte et d'acheminement ; gants, pots stériles, couteau propre et une glacière.

V-3.1.2. Au niveau du laboratoire

V-3.1.2.1. A l'institut Pasteur d'Algérie :

Toutes les étapes du diagnostic de laboratoire ont été réalisées sous une hotte de biosécurité en utilisant un bec Bunsen.

Le matériel de laboratoire correspond à celui des laboratoires de diagnostic de la tuberculose et des mycobactéries, en l'occurrence, le matériel de culture bactérienne où nous avons utilisé le matériel suivant : des boîtes de Pétri, des bistouris, tubes en verre stériles, autoclave, pipettes Pasteur, mortiers, eau distillée, milieu de culture Löwenstein-Jensen, étuve, agitateur et la soude comme décontaminant (NaOH à 4%).

V-3.1.2.2. A l'Institut Hospitalier Universitaire, Méditerranée Infection de Marseille (France)

Toutes les étapes du diagnostic ont été réalisées dans un laboratoire de niveau de biosécurité 3 (NSB 3 ; Niveau Sécurité Biologique 3) et un laboratoire de niveau de biosécurité 2 (NSB 2).

✓ Laboratoire de niveau de biosécurité 3 (NSB 3)

Au niveau du laboratoire NBS3, nous avons utilisé un bistouri stérile à usage unique, des boîtes de Pétri stériles, des pinces stériles en plastique, des pipettes graduées stériles, tubes Falcon de 50 mL, des tubes Eppendorfs, un broyeur de Potter, une étuve et un bain sec.

Nous avons également utilisé ;

- **Des réactifs** ; comme la Chlorhexidine à 1% (digluconate de chlorhexidine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), une solution saline tamponnée au phosphate stérile (PBS), la lécithine d'œuf, Tween 80, glycérol (Euromedex, Souffelweyersheim, France) et pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich).

- **Des milieux de culture** ; un milieu solide Middlebrook 7H10, une solution d'acide oléique, de l'albumine, du dextrose et de la catalase (OADC) (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), un milieu liquide Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) et milieu Coletsos (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France).

Toutes les manipulations ont été faites sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) (**Figure 17**).



Figure 17 : Manipulation sous PSM dans un laboratoire NSB3

✓ **Laboratoire de niveau de biosécurité 2 (NSB 2)**

Au niveau du laboratoire NBS2, nous avons utilisé une poudre de verre (Sigma- Aldrich), l'appareil FastPrep (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), un kit d'extraction d'ADN ; kit Qiagen (Qiagen, Courtaboeuf, France), un extracteur EZ1, un thermocycleur, une plaque blanche Machery Nagel, plaque Millipore MAHV5, plaque MicroAmp N801-560, une poudre Séphadex, centrifugeuse et un séquenceur.

V-3.2. Méthodes

V-3.2.1. Au niveau des abattoirs :

Comme notre étude a été menée dans cinq abattoirs et durant des périodes différentes, nous avons jugé utile de faire intégrer des étudiants en fin de cycle du cursus vétérinaire en leur assurant une formation théorique et en leur expliquant la spécificité de l'aspect des lésions suspectes de tuberculose. De plus, une fois dans les abattoirs, ces étudiants ont été dirigés tout au long du travail par des vétérinaires inspecteurs de ces abattoirs.

Nous présentons les méthodes utilisées dans la présente étude selon la chronologie des événements.

V-3.2.1.1. Inspection *post-mortem*

Cette phase commence de la saignée jusqu'à l'inspection proprement dite qui nous intéresse le plus dans notre étude.

Lorsque l'opération d'habillage est terminée, c'est au tour du vétérinaire inspecteur de procéder à l'inspection des carcasses et des abats. Cette inspection comprend un examen visuel, une palpation et une incision des organes.

Pour la détermination de l'âge, nous avons classé les animaux en trois tranches d'âge, jeunes moins de deux ans (< 2ans), adultes entre un et trois ans (2-5 ans) et âgés pour les sujets de plus de cinq ans (> 5ans).

V-3.2.1.2. Collecte et acheminement des prélèvements

Nous avons prélevé des lésions macroscopiques suspectes de tuberculose au niveau des organes et/ou leurs ganglions draineurs.

Les échantillons ont été recueillis dans des flacons stériles, à usage unique, pré étiquetés. Ces flacons étaient fermés hermétiquement, pour éviter tout risque de contamination lors du transport.

Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignements (Cf. annexe) indiquant le lieu et la date du prélèvement, l'âge estimé, le sexe, et l'état d'embonpoint de l'animal et l'organe prélevé.

Un numéro est attribué à chaque prélèvement, ce numéro est reporté sur la fiche de renseignements correspondante. Ces prélèvements sont acheminés dans une glacière au laboratoire.

V-3.2.2. Au niveau de laboratoire

Les prélèvements issus des carcasses et/ou organes présentant des lésions macroscopiques suspectes de tuberculose au moment de l'inspection ont été traités à l'Institut Pasteur d'Algérie à Alger et à l'institut hospitalo-universitaire de Marseille, comme suit ;

- Les prélèvements réalisés à l'abattoir de Médéa et Mouzaia (W. Blida) durant 2016-2017 ont été traités à l'Institut Pasteur d'Algérie après un délai court de congélation.
- Les prélèvements réalisés à l'abattoir de Bgayet, Sétif et Boufarik (W. Blida) durant l'année 2018 ont été traités à l'institut hospitalo-universitaire de Marseille après 11 à 15 mois de congélation à -20°C.

V-3.2.2.1. A l'Institut Pasteur d'Algérie

Nous avons procédé à la décontamination des échantillons et à leur mise en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen.

De ce fait, nous avons procédé à la découpe des échantillons avec un bistouri précédemment flambé. Ensuite, nous avons procédé à leur mise en culture ;

Préparation de la culture

La préparation de la culture passe par plusieurs étapes, à savoir :

a) Broyage des tissus :

A l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles, un fragment du prélèvement est finement broyé.

b) Décontamination :

La méthode de Petroff (1915) à la soude permet de décontaminer le produit de broyage.

Étapes :

- ✓ Nous avons ajouté 04 ml de NaOH à 4% dans le mortier (**Figure 18**), que nous avons mélangé avec le broyat à l'aide du pilon.



Figure 18 : Décontamination de l'homogénéisât avec NaOH.

- ✓ Le contenu du mortier est aspiré par une pipette, ensuite versé dans un tube conique stérile que nous avons mis sur agitateur (**Figure 19**) pendant 10 minutes.

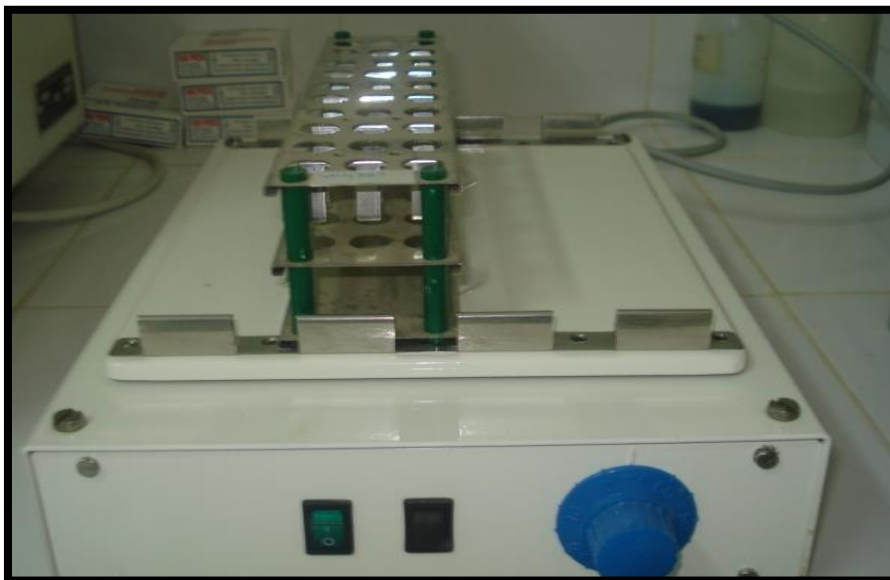


Figure 19 : Agitation de tube sur agitateur de Kahn

- ✓ Puis centrifuger (**Figure 20**) à 3.000 rpm pendant 15 minutes.



Figure 20 : Centrifugation de la suspension.

- ✓ Les 15 minutes écoulées, nous récupérons le tube, le surnageant est jeté et nous lavons à l'eau distillée stérile (10 à 15ml).
- ✓ Une re-centrifugation à 3.000 rpm pendant 15minutes est réalisée.
- ✓ Nous laissons le tube jusqu'à formation d'un culot, et d'un surnageant, ce dernier est jeté.

c) Mise en culture :

Le culot obtenu est ensemencé (**Figure 21**) sur trois ou quatre tubes de Lowenstein-Jensen.

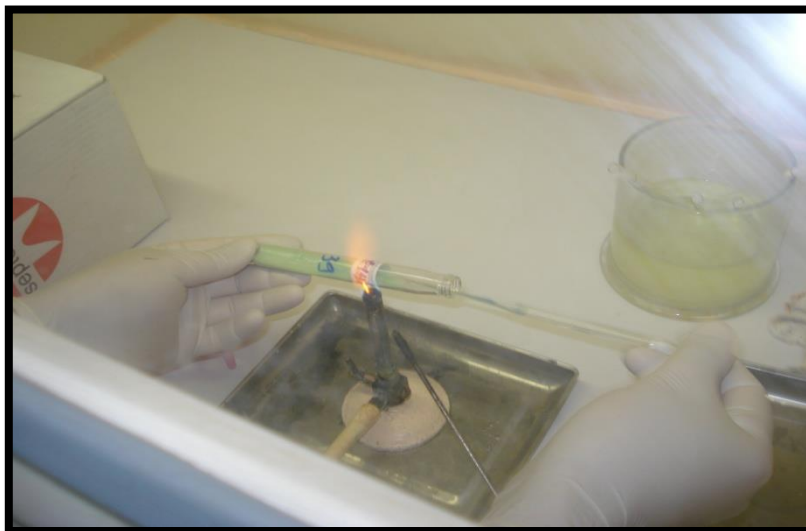


Figure 21 : Ensemencement sur milieu de Löwenstein-Jensen.

Le numéro de l'ordre de chaque prélèvement est reporté sur les tubesensemencés correspondants, les tubes sont ensuite placés dans l'étuve à 37°C, horizontalement, en position inclinée (**Figure 22**) sans les fermer hermétiquement pour permettre l'évaporation de la partie liquide.



Figure 22 : Tubes placés sur portoirs dans l'étuve

Les tubes seront examinés, bouchés et dépistés des éventuelles contaminations vers la fin de la première semaine. Les contaminations engendrent une modification de la teinte du milieu (jaunissement ou verdissement ou parfois noircissement) et des poussées de mycobactéries atypiques à croissance rapide peuvent également être rencontrées dès les premiers jours. Les milieux de culture contaminés sont éliminés et les tubes avec mycobactéries à croissance rapide sont sortis pour l'identification phénotypique. Les tubes négatifs sont remis à l'étuve, et la lecture se poursuit ultérieurement une fois par semaine.

d) Identification phénotypique

Pour identifier les cultures déclarées positives, nous nous sommes basés sur l'identification phénotypique qui s'appuie sur deux critères, en l'occurrence : le délai d'apparition des colonies et leur pigmentation (Narvaiz de Kantor et *al.*, 1998).

Puis, les cultures déclarées positives ont été transportées dans un emballage réglementaire estampillé UN 2814 correspondant au transport de matériel biologique de

catégorie A et cela à une température ambiante à l'Institut Hospitalo-Universitaire de Marseille (France).

V-3.2.2.2. A l'Institut Hospitalo-Universitaire de Marseille

Les prélèvements réalisés à l'abattoir de de Bgayet, Sétif et Boufarik (w. Blida) durant l'année 2018 et après une congélation à -20°C , ont été transportés sous glace à l'Institut Hospitalo-Universitaire de Marseille (France).

A leur arrivée à l'Institut Hospitalo-Universitaire, les cultures obtenues à l'Institut Pasteur d'Algérie sur milieu de Löwenstein-Jensen et les prélèvements cliniques (lésions macroscopiques suspectes de tuberculose) ont été mis dans le laboratoire de NSB3, où ils étaient conservés comme suit ;

- Les tubes de cultures ont été gardés dans leur emballage de transport et placés dans un réfrigérateur à $+4^{\circ}\text{C}$.
- Les prélèvements cliniques ont été directement remis dans un congélateur à -80°C .

La manipulation des prélèvements est réalisée dans un PSM du laboratoire NSB3 où les lésions macroscopiques suspectes de tuberculose ont été laissées se décongeler à température ambiante.

Une fois décongelés, nous avons procédé à la découpe des échantillons (**Figure 23**) avec un bistouri et une boîte de Pétri stériles et à usage unique.



Figure 23 : Lésions suspectes de tuberculose au niveau des ganglions

Après la découpe des échantillons, nous avons procédé à leur :

a) Décontamination :

- ✓ Nous avons mis une parcelle de l'échantillon dans un tube Falcon. Pour les ganglions, nous avons préféré de prendre la partie interne qui est plus propre que la partie externe.
- ✓ Nous avons ajouté un triple volume de Chlorhexidine à 1% (digluconate de chlorhexidine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Asmar et Drancourt, 2015).
- ✓ Nous avons laissé la Chlorhexidine à 1% agir pendant 30 minutes à température ambiante avec agitation manuelle toutes les cinq minutes.
- ✓ Après élimination de la Chlorhexidine, 10 mL d'une solution neutralisante [1000 mL de solution saline tamponnée au phosphate stérile (PBS), 3 g de lécithine d'œuf et 10 mL de Tween 80] ont été ajoutés et le mélange a été laissé à température ambiante pendant 10 minutes sous agitation afin d'inactiver la Chlorhexidine restante.
- ✓ Une série de trois lavages au PBS stérile a été faite.

b) Broyage :

Le tissu décontaminé a été finement écrasé à l'aide du broyeur de Potter stérile.

c) Mise en culture :

Le contenu du mortier est aspiré par un pipeteur Pipetboy, puis une partie a été remise à -80°C et une autre partie du broyat est ensuite inoculée dans quatre types de milieux de culture, y compris :

- Milieu solide Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) contenant 10% (v / v) d'acide oléique, de l'albumine, du dextrose et de la catalase (OADC) (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) et 0,5% (v / v) de glycérol (Euromedex, Souffelweyersheim, France);
- Milieu solide Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) contenant 10% (v / v) OADC (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) et pyruvate de sodium (4,16 mg / ml) (Sigma-Aldrich) (Chambers et *al.*, 2000, Dean, et *al.*, 2015);
- Milieu liquide Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), contenant 10% d'OADC (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) et 0,05% de Tween 80 (Sigma-Aldrich) (García-Barragán et *al.*, 2018) ;

- Milieu Coletsos (Bio-Rad, Marnes-la- Coquette, France).

Le numéro de l'ordre de chaque prélèvement est reporté sur les boîtes et les tubes correspondants, qui sont ensuite mis à l'étuve à 37°C pendant 12 semaines avec un suivi de 10 jours de la croissance des colonies.

Les tubes et les boîtes seront régulièrement examinés pour la recherche des éventuelles contaminations vers la fin de la première semaine. Les contaminations peuvent être d'origine bactérienne (bactéries à croissance rapide) ou mycosiques et elles peuvent se traduire par une apparition de colonies, une modification de la couleur du milieu ou par une colonisation blanchâtre de ce dernier (des champignons dans la plus part des cas). Les milieux de culture contaminés par les champignons sont directement sortis et éliminés, ceux contaminés par des bactéries à croissance rapide sont sortis pour l'identification microscopique (contrôle de Ziehl) dans le but de chercher des mycobactéries (B.A.A.R.). Les tubes négatifs sont remis à l'étuve, avec un suivi de 10 jours de la croissance des colonies.

c) Identification des isolats

Les colonies développant sur l'un des milieux solides, que ce soit celles qui ont cultivé sur milieu Löwenstein-Jensen que nous avons déjà isolées à l'Institut Pasteur d'Algérie ou celles que nous avons nouvellement isolées à IHU de Marseille, ont été raclées à l'aide d'une oese stérile en plastique et à usage unique puis dissoutes dans un tube Eppendorf contenant 200µL de PBS, puis inactivées à 100 ° C pendant une heure à l'aide d'un bain sec (**Figure 24**).



Figure 24 : Inactivation des isolats (bain sec à 100 °C)

Une fois inactivées, les bactéries peuvent être sorties du laboratoire NSB 3 et manipulées dans le laboratoire de niveau de biosécurité 2 (NSB 2), dans lequel nous avons procédé à une extraction d'ADN, à une réalisation d'une série de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et enfin à une analyse de la séquence du génome entier dans le but d'identifier les isolats ;

✚ Extraction de l'ADN

Nous avons d'abord réalisé une lyse externe, en ajoutant au 200 µL de l'échantillon liquide, 200 µL Tampon G2, 20 µL PK (La protéinase-K), et laisser pendant 2 h ou over-night à 56°C (Manuel IHU, 2017).

L'ADN total a été extrait en vortexant la suspension avec de la poudre de verre (Sigma-Aldrich) en utilisant l'appareil FastPrep (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) (Angelakis et *al.*, 2009) (**Figure 25**). Ensuite, l'extraction est réalisée avec un extracteur EZ1 (**Figure 26**) en transférant 200 µL de la suspension déjà vortexée dans un tube échantillon (fond plat) du kit Qiagen (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'ADN total a été récupéré dans un tube d'élution.

L'ADN extrait est récupéré puis conservé à -20°C pour une réalisation ultérieure de séries de *Polymerase Chain Reaction* (PCR).



Figure 25 : Appareil FastPrep



Figure 26 : Extracteur EZ1

Polymerase Chain Reaction

La PCR séquençage ciblant le gène *rpoB* (GGCAAGGTCACCCCGAAGGG et AGCGGCTGCTGGGTGATCATC) (Adékambi et *al.*, 2003) a ensuite été réalisée afin de confirmer le complexe *M. tuberculosis*. Pour cela, nous avons d'abord procédé à une reconstitution et dilution des amorces de *rpoB* dans une salle spéciale dédiée aux reconstitutions et les dilutions des amorces où l'introduction de tout type d'ADN est interdit. Sous une sorbonne, nous avons suivi les instructions du fabricant, où nous avons ;

Repéré sur le tube la quantité en nmol : x nmol.

Ajouté x μL d'eau Rnase Dnase Free.

Laisser environ 10 min à température ambiante puis vortexé.

Concentration de la solution : 1 nmol/ μL soit 1000 μM .

Dilution au 1/50^{ème} pour avoir une solution fille à 20 μM .

Une fois les amorces sont reconstituées, nous avons préparé le Mix de PCR standard à raison de 45 μL pour un seul prélèvement [25 μL d'ATG Master Mix (2X), 17 μL H₂O, 1.5 μL amorce F à 20 μM et 1.5 μL amorce R à 20 μM]. Une fois le mix est préparé, nous l'avons distribué à raison de 45 μL dans chaque cupule qui seront fermées et transférées dans une autre salle où nous avons ajouté 5 μL d'ADN de chaque isolat au 45 μL du mix déjà préparé dans le but de lancer la PCR standard *rpoB*.

a) Programme PCR Standard

Nous avons placé les cupules contenant le mix de PCR et l'ADN dans un thermocycleur (**Figure 27**) et nous avons suivi le programme de PCR standard spécifique au système *rpoB* : dénaturation à 95°C pendant 15 min, [dénaturation ; à 94°C pendant 30sec, hybridation : à 64°C pendant 30sec, élongation ; à 72°C pendant 1min] X 35 cycles, élongation finale ; à 72°C pendant 5 min.



Figure 27 : Un thermocycleur

b) Pcr-Séquençage

Après avoir récupéré le produit de PCR standard, nous avons procédé à sa purification, où nous avons ;

- ✓ Ajouté 50 μ L d'eau distillée au produit de PCR à purifier.
- ✓ Déposé la totalité du mélange sur une plaque blanche *Machery Nagel*.
- ✓ Mis la plaque en aspiration pendant 10 min, manomètre à 25 environ (**Figure 28**).
- ✓ Séché la plaque sur du papier filtre avant d'ajouter 50 μ L d'eau distillée.
- ✓ Mis la plaque en agitation pendant 10 min, vitesse 600 (**Figure 29**).
- ✓ Enfin, récupéré les 50 μ L de produit de PCR purifié dans des cupules préalablement identifiées.

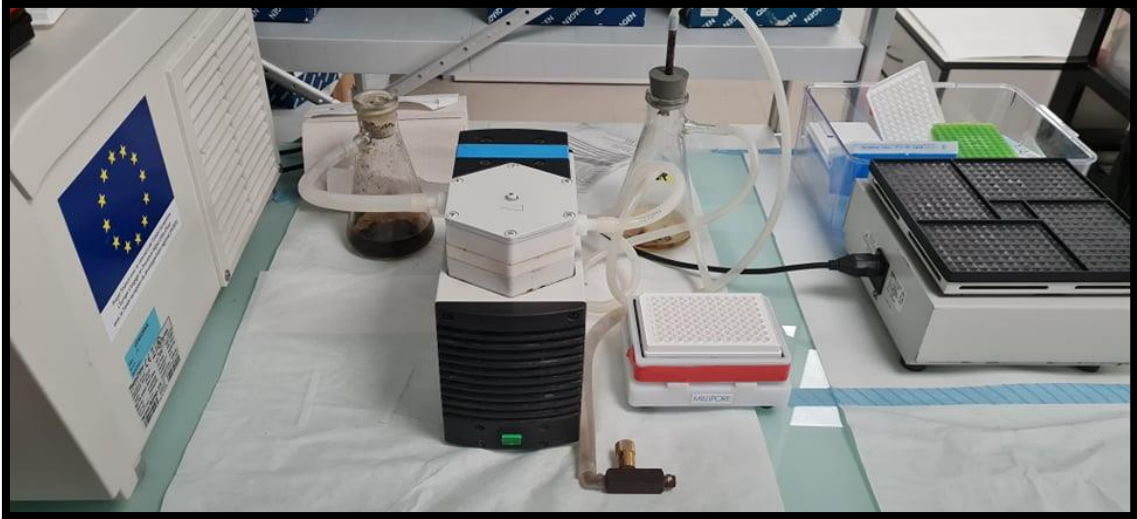


Figure 28 : La plaque en aspiration.



Figure 29 : La plaque en agitation.

Nous avons par la suite préparé le mix de PCR-séquençage (Bigdye) et nous avons mis dans chaque cupule une quantité de 6 μL de ce mix [1 μL de Bigdye, 1.5 μL de Tampon BDV1, 0.5 μL d'Amorce F/R 10 μM (une cupule par amorce) et 3 μL H₂O] à laquelle nous avons ajouté 4 μL d'ADN purifié.

Nous avons placé ces cupules dans le thermocycleur et nous avons suivi le programme suivant (Manuel IHU, 2017) :

Dénaturation à 96°C pendant 1 min, [dénaturation ; à 96°C pendant 10 sec, hybridation : à 50°C pendant 5 sec, élongation ; à 60°C pendant 3 min] X 25 cycles.

➤ **Préparation de la plaque de Séphadex**

Nous avons préparé une plaque Séphadex qui sert à purifier le produit de PCR. Pour cela, nous avons ;

- Mis la résine sur la plaque noire, rempli les puits et éliminé le surplus.
- Posé une plaque *Millipore MAHV5*. La caler en butée puis retourner le tout pour faire tomber la résine dans tous les puits.
- Ajouté 300 µL d'eau distillée, laissé gonfler la résine pendant 2h30 à 3h.

Cette plaque peut se conserver une journée à température ambiante.

Pour une durée plus importante, la placer à +4 °C et la sortir du réfrigérateur au moins 15 min avant utilisation.

➤ **Purification de la réaction de séquence**

Une fois la plaque Séphadex est prête, nous avons procédé à sa centrifugation avec son couvercle après l'avoir posée sur une plaque dite « poubelle » afin d'éliminer l'excédent d'eau.

Cette centrifugation dure 2 min à 1.238 g.

- ✓ Ajouter 10 µL EDS aux produits de séquence.
- ✓ Poser la plaque de Séphadex sur une plaque *MicroAmp N801-560* (**Figure 30**) qui aura été préalablement identifiée.



Figure 30 : Plaque de Séphadex sur une plaque *MicroAmp N801-560*

- ✓ Déposer, bien au centre des mini colonnes et sans toucher les parois, les 20 µL de produits de séquence,
- ✓ Centrifuger pendant 2 min à 1.238 g et avec couvercle.
- ✓ Enfin, La plaque *MicroAmp* est prête à être placée sur le séquenceur.
- ✓ Nous devons mettre de l'eau en cas de cupules vides sur un run de 16 échantillons.

Le séquençage est réalisé avec le séquenceur automatique ABI (Applied Biosystems) (**Figure 31**) et les résultats seront récupérés dans une clé USB.

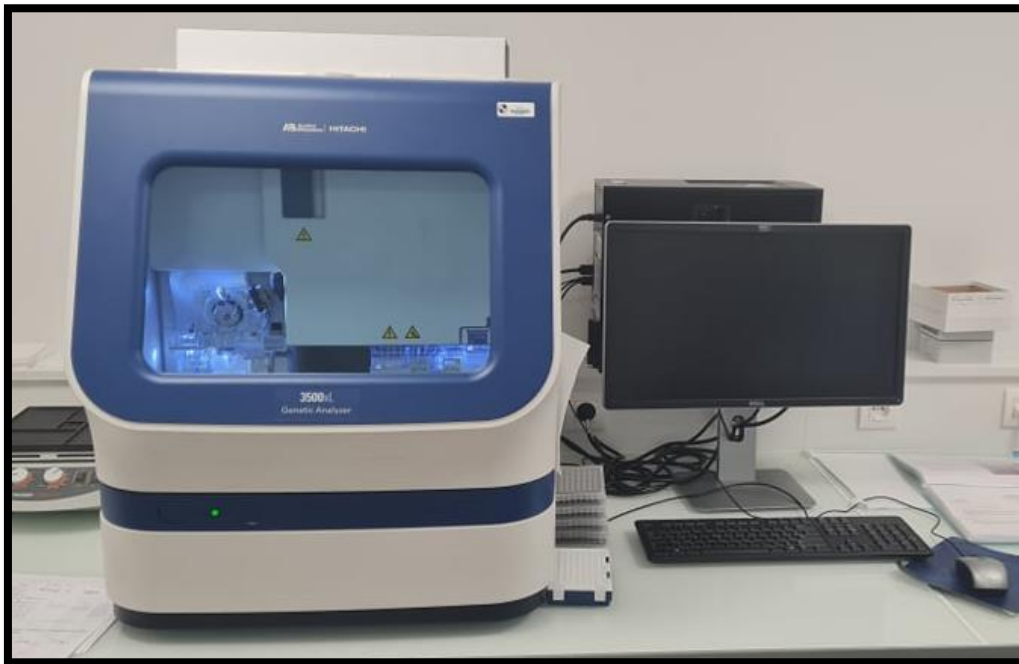


Figure 31 : Un séquenceur

Pour l'analyse, l'assemblage et la correction des séquences, le logiciel *ChromasPro* (*ChromasPro 2015 version 1.7.7*, Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) a été utilisé. Cette correction est réalisée par vérification visuelle de l'aspect des électrophérogrammes.

Après avoir corrigé les séquences, celles-ci sont comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank dans le but de chercher d'homologie de séquences, et cela par NCBI BLAST sur le site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

✚ Analyse du séquençage du génome entier

Avant de réaliser les analyses de la séquence du génome entier (WGS), un numéro de CSUR (Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies) a été attribué pour chaque souche.

Comme pour les expériences de séquence du génome entier (WGS), l'ADN a été extrait à l'aide de la matrice InstaGene™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), et quantifié en utilisant un test Qubit avec le kit haute sensibilité (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). La qualité de l'ADN est évaluée par *bioanalyzer*.

Une quantité de 0,2 µg / µL d'ADN a ensuite été séquencé par des essais Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, USA). L'ADN a été fragmenté et amplifié par PCR limitée (12 cycles), en introduisant des codes-barres à double index et des adaptateurs de séquençage.

Après purification sur des billes AMPure XP (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA), les bibliothèques ont été normalisées et regroupées pour séquençage sur le MiSeq. Le séquençage en paire «Paired-end» et la génération automatisée de cluster avec des lectures à double indexation de 2 × 250 pb ont été effectués.

Les lectures de séquençage de sortie ont été analysées à l'aide de MTBseq (Kohl et al., 2018) pour identifier les espèces, les lignées et les sous-lignées et pour calculer la distance SNP entre les souches étudiées. MTBseq a également été utilisé pour extraire et aligner les SNP entre les études du génome. Les résultats de l'identification ont été soutenus par d'autres outils tels que TB Profiler et Mykrobe Predictor-TB (Coll et al., 2015 ;Huntet al., 2019). Un arbre phylogénétique basé sur des SNP extraits entre 105 génomes de *M. bovis* a été généré à l'aide des outils en ligne PhyML 3.0 (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=phym1; consulté en octobre 2020).

Analyses statistiques

Les données recueillies ont été analysées à l'aide des logiciels SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 23.0) et Microsoft Office Excel. Comme critère, les indicateurs de différence de fiabilité ont utilisé le profil $p < 0,05$. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de tests du Chi carré pour comparer la présence de facteurs de risque entre les cas suspects de tuberculose et pour comparer les proportions de génotypes de *M. bovis*, parmi d'autres génotypes dans différentes régions géographiques/pays. Nous avons délimité quatre groupes de données : Groupe 1, tous les pays de la base de données des 3.364 isolats ; Groupe 2, tous les pays Africains de la base de données ; Groupe 3, tous les pays Américains ; et Groupe 4, tous pays Européens.

Les présentations graphiques ont été effectuées à l'aide de Microsoft Office Excel 2013.

Pour l'assemblage et analyse des électrophérogrammes obtenus, nous avons utilisé le logiciel ChromasPro (*ChromasPro 2015 version 1.7.7*, Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) puis nous les avons comparés à ceux disponibles dans la base de données GenBank par NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

V-4. RESULTATS

Les résultats ont été obtenus au niveau de l'abattoir et au niveau de laboratoire.

V-4.1. Résultats de l'abattoir

V-4.1.1. Prévalence des lésions suspectes de la tuberculose bovine

Dans les cinq abattoirs et durant les périodes d'études indiquées précédemment, un total de 928 bovins ont été abattus puis régulièrement inspectés dont 94 présentaient des lésions macroscopiques suspectes tuberculeuses, soit une prévalence de 10,13% (IC 8,24-12,34%).

La proportion des cas suspects de tuberculose bovine dans chaque abattoir est présentée dans le **Tableau 5** et illustrée par la Figure **32** :

Tableau 5 : Proportion des cas suspects de lésions tuberculeuses dans les cinq abattoirs

Abattoirs	Carcasses inspectées (n)	Carcasses suspectes (n)	Prévalence (%)
Bgayet	171	10	5,84
Sétif	153	16	10,45
Boufarik	342	26	7,6
Mouzaia	195	28	14,36
Médéa	67	14	20,9
Total	928	94	10,13 (IC 8,24-12,34%)

Nous constatons qu'il y a une différence statistiquement significative ($p=0.001$) entre les abattoirs et nous pouvons conclure que l'abattoir de Médéa (20,9%) est le plus touché, par contre le moins touché est celui de Bgayet (5,84%).

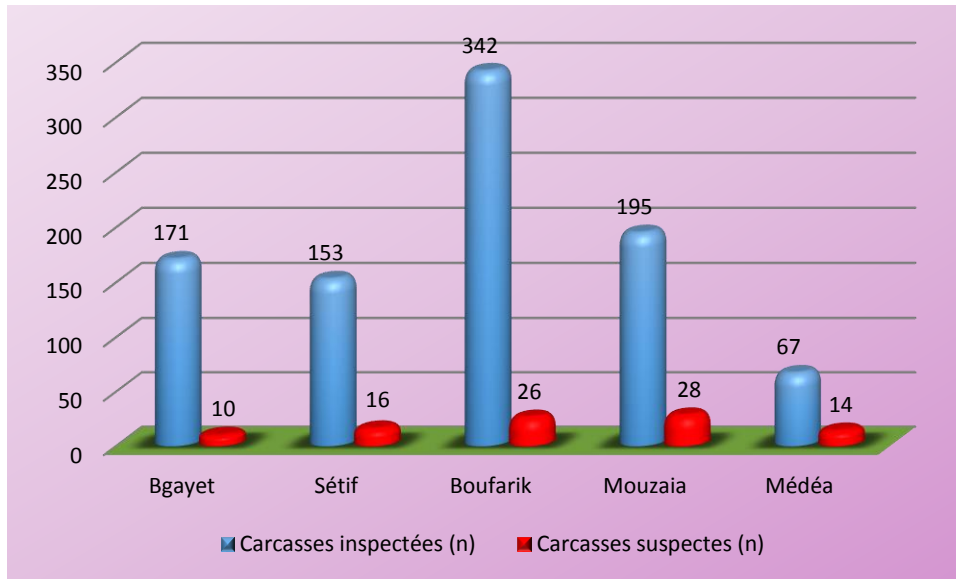


Figure 32 : Prévalence des cas suspects de lésions tuberculeuses dans les cinq abattoirs.

V-4.1.2. Les facteurs de variation

Nous avons procédé à l'identification des animaux abattus dans les cinq abattoirs, où nous avons pris en considération trois facteurs à savoir ; le sexe, l'âge et l'état d'embonpoint des animaux.

V-4.1.2.1. Répartition des animaux abattus en fonction des facteurs de variation

✚ Sexe :

Les résultats de cette identification en fonction du sexe sont présentés dans la Figure 33

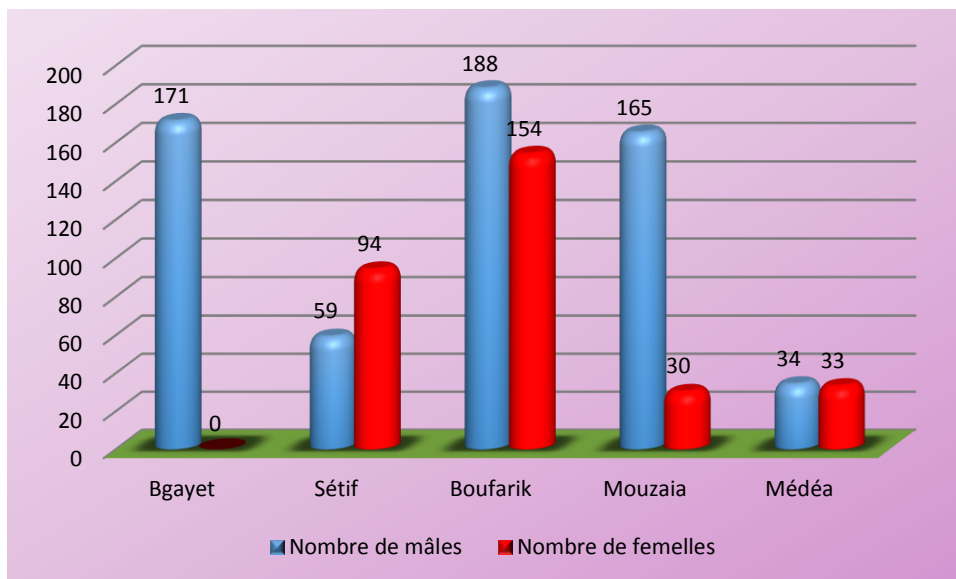


Figure 33 : Animaux abattus en fonction du sexe.

Nous avons enregistré que le nombre de mâles abattus ($n=617/928$; 66,5%) est significativement ($p < 10^{-4}$) plus important que celui des femelles ($n=311/928$; 33,5%).

A l'abattoir de Bgayet nous avons constaté que les bovins abattus sont exclusivement ($n=171/171$; 100%) des mâles avec une absence totale de femelles. A l'abattoir de Boufarik et celui de Mouzaia, le nombre de mâles dépasse celui des femelles avec ($188/342$ versus $154/342$ et avec un sex-ratio M/F de 1,22) et ($165/195$ versus $30/195$, avec un sex-ratio M/F de 5,5), respectivement.

A l'abattoir de Médéa, le nombre de mâles est presque égal à celui des femelles ($34/67$ versus $33/67$, avec un sex-ratio M/F de 1,03). Néanmoins, à l'abattoir de Sétif, nous avons constaté que le nombre de femelles abattus dépasse celui des mâles ($n=94/153$ versus $59/153$), avec un sex-ratio F/M de 1,6.

Age :

Les résultats de cette identification en fonction de l'âge sont illustrés dans la Figure 34.

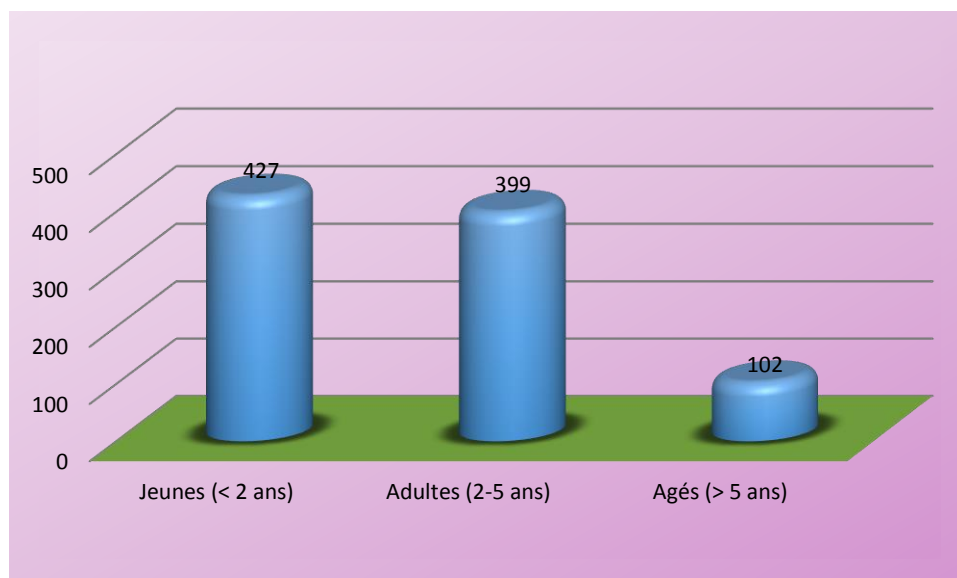


Figure 34 : Animaux abattus en fonction de l'âge.

La plupart des animaux abattus étaient des animaux jeunes de <2 ans ($n = 427/928$; 46%), suivis des animaux adultes dont l'âge est de 2 à 5 ans ($n = 399/928$; 43%) et les animaux âgés de plus de cinq ans ($n = 102 / 928$; 11%).

✚ Etat d'embonpoint :

Les résultats de cette identification en fonction de l'état d'embonpoint sont illustrés dans la Figure 35.

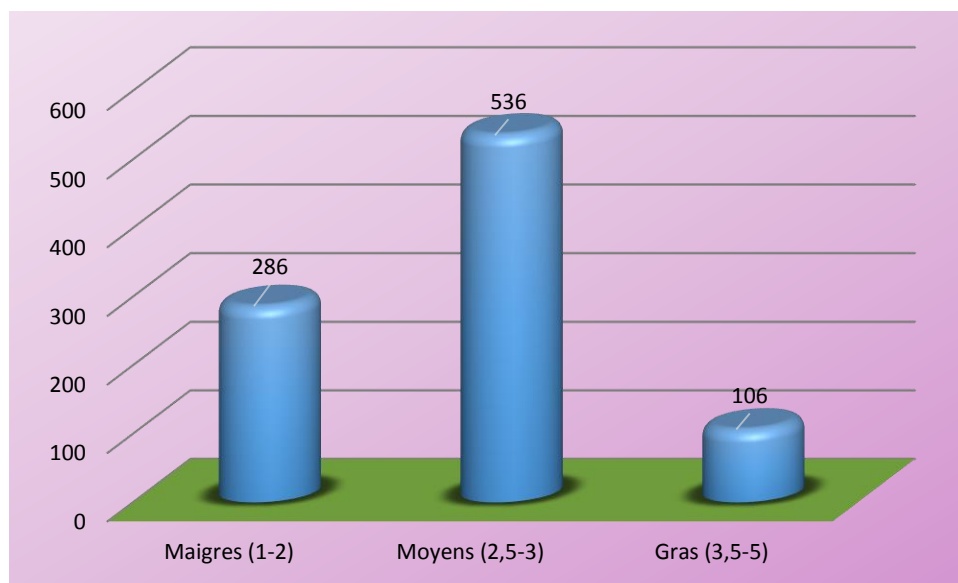


Figure 35 : Animaux abattus en fonction de l'état d'embonpoint

La plupart des animaux abattus étaient de poids moyen (score 2,5-3) ($536/928$; 57,75%), suivis des animaux maigres (score 1-2) ($286/928$; 30,81%) et les animaux dont l'état d'embonpoint est jugé gras (score 3.5-5) ($106/928$; 11,42%).

V-4.1.2.2. Répartition des cas suspects en fonction des facteurs de variation

✚ Sexe :

Les résultats relatifs à la prévalence des lésions suspectes de tuberculose chez les bovins en fonction du sexe sont rapportés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Répartition des cas suspects de tuberculose en fonction du sexe

Abattoir	Mâle			Femelle		
	Car insp	Car susp	%	Car insp	Car susp	%
Bgayet	171	10	5,84	00	00	00
Sétif	59	02	3,39	94	14	14,89
Boufarik	188	14	7,44	154	12	7,79
Mouzaia	165	21	12,72	30	07	23,33
Médéa	34	06	17,64	33	08	24,24
Total	617	53	8,59	311	41	13,18

Car : Carcasses, insp : inspectées, susp : suspectées.

La prévalence des lésions tuberculeuses était significativement ($p = 0,038$) plus élevée chez les femelles ($n = 41/311$; 13,18%) que chez les mâles ($n = 53/617$; 8,59%).

Age :

Les résultats relatifs à la prévalence des lésions suspectes de tuberculose des bovins en fonction de l'âge sont rapportés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Répartition des cas suspects de tuberculose en fonction de l'âge.

Abattoir	Jeunes (< 2 ans)			Adultes (2-5 ans)			Agés (>5 ans)		
	Car insp	Car susp	%	Car insp	Car susp	%	Car insp	Car susp	%
Bgayet- Sétif	173	13	7,51	123	10	8,13	28	03	10,71
Boufarik	171	08	4,67	132	08	6,06	39	10	25,64
Mouzaia	56	17	30,35	122	04	3,27	17	07	41,17
Médéa	27	04	14,81	22	04	18,18	18	06	33,33
Total	427	42	9,83	399	26	6,51	102	26	25,5

Car : Carcasses, insp : inspectées, susp : suspectées.

Les animaux plus âgés (> 5 ans) ont été les plus touchés (25,5%), suivis des jeunes animaux (<2 ans) avec 9,83%, puis des animaux adultes (2 à 5 ans) avec 6,51%. Les différences entre les valeurs de prévalence étaient significatives, $p < 10^{-4}$.

✚ Etat d'embonpoint :

Les résultats relatifs à la prévalence des lésions suspectes de tuberculose des bovins en fonction de l'état d'embonpoint sont rapportés dans la Figure 36.

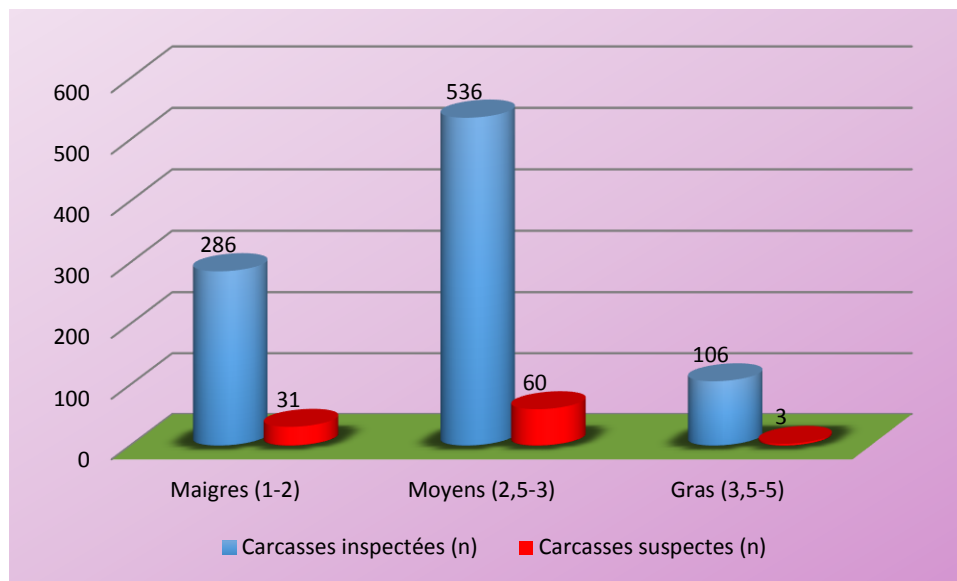


Figure 36 : Répartition des cas suspects de tuberculose en fonction de l'état d'embonpoint.

Pour les animaux suspects de tuberculose, les animaux du poids moyen ont été les plus touchés (60/536 ; 11,19%), suivis de ceux qui étaient maigres (31/286 ; 10,83%), puis des animaux dont l'état d'embonpoint est jugé gras (03/106 ; 2,83%). La différence entre les valeurs de prévalence était significative, $p = 0,03$.

V-4.1.3. Localisation des lésions

Les résultats relatifs à la distribution des lésions sont rapportés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Répartition de la localisation des lésions.

Localisation	Lésions suspectes (n)	%
Ganglions	90	95,74
Poumons	03	3,19
Foie	01	1,06
Total	94	100

Ces mêmes résultats sont également illustrés dans la Figure 37

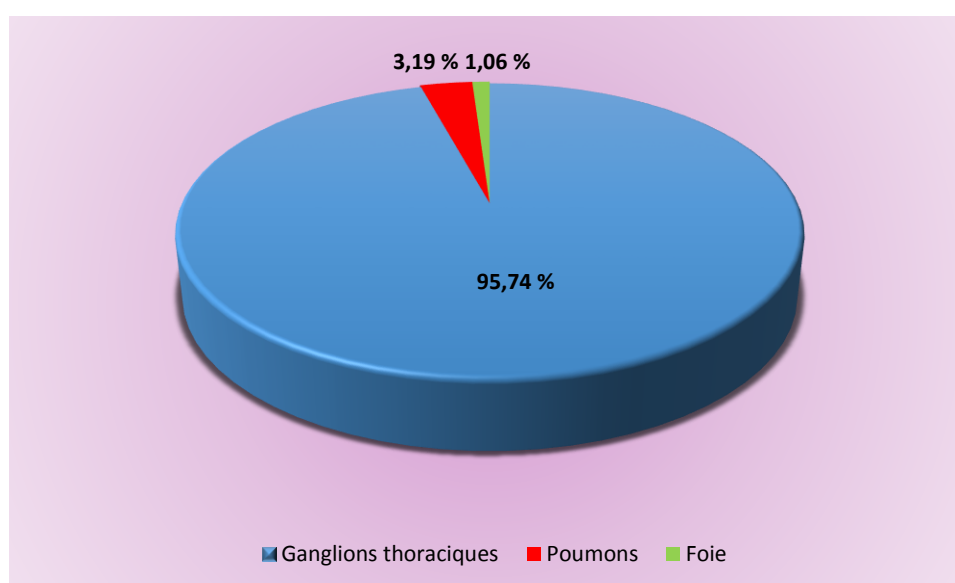


Figure 37 : Localisation des lésions suspectes de tuberculose sur les organes.

Nos résultats ont indiqué que les lésions tuberculeuses étaient principalement localisées (90/94 ; 95,74%) dans les ganglions lymphatiques et 4,26% (4/94) dans les viscères dont trois poumons (3/94 ; 3,19%) et un foie (1/94 ; 1,06%).

Localisation des lésions par abattoir

Les résultats de la localisation des lésions dans quatre abattoirs (Bgayet, Sétif, Boufarik et Mouzaia) sont illustrés dans le **Tableau 9** et ceux de l'abattoir de Médéa sont rapportés dans le **Tableau 10**.

Tableau 9 : Répartition de la localisation des lésions dans quatre abattoirs

Organes	Lésions suspectes	%
Ganglions thoraciques	77	96,25
Poumons	03	3,75
Total	80	100

Dans les quatre abattoirs, à savoir l'abattoir de Bgayet, Sétif, Boufarik et Mouzaia et après l'inspection de 861 carcasses qui sont y parvenues, il en ressort que 80 carcasses étaient porteuses de lésions suspectes de tuberculose et que ces dernières sont exclusivement (100%) localisées dans la cage thoracique dont 96,25% (n=77/80) au niveau des ganglions lymphatiques de l'appareil respiratoire et 3,75% (n=3/80) au niveau du parenchyme pulmonaire.

A l'abattoir de Médéa, nous avons signalé l'existence des lésions à localisations multiples sur une même carcasse, exemple une lésion au niveau d'un ganglion de la tête et une autre sur un ganglion thoracique sont simultanément rencontrées chez le même bovin.

Tableau 10 : Répartition de la localisation des lésions dans l'abattoir de Médéa.

Organes	Lésions suspectes (n)	%
Ganglions ;	19	90,47
Ganglions thoraciques	13	68,42
Ganglions de la tête	06	31,57
Foie	02	9,52
Total	21	100

Sur les 67 carcasses inspectées, 14 animaux étaient porteurs de lésions tuberculeuses chez lesquels 21 localisations sont observées (localisations multiples). Nous avons remarqué une prédominance ganglionnaire (90,47%, n=19/21) dont 68,42% (n=13/19) des lésions au niveau des ganglions thoraciques et 31,57% (n=6/19) sur les ganglions de la tête. 9,52% (n=2/21) des lésions étaient localisées au niveau du foie.

Nous présentons dans les figures **38, 39, 40 et 41** quelques lésions rencontrées durant notre enquête.



Figure 38: Tuberculose au niveau du ganglion trachéo-branchique droit.



Figure 39 : Tuberculose au niveau pulmonaire.

Masse caséuse
d'aspect purulent

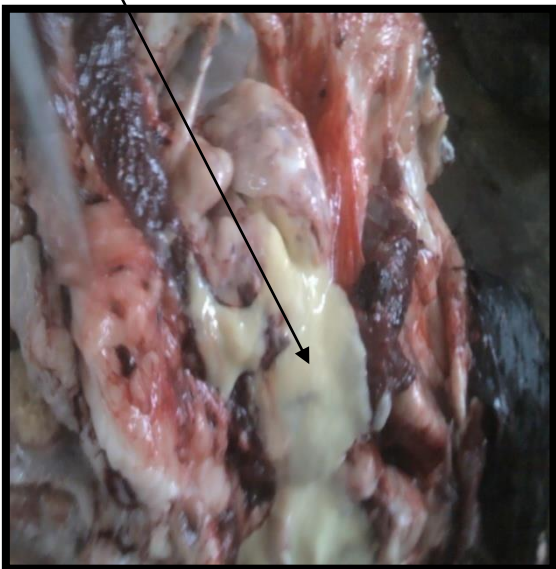


Figure 40 : Lésion caséuse au niveau de nœud lymphatique parotidien.

Masse caséuse

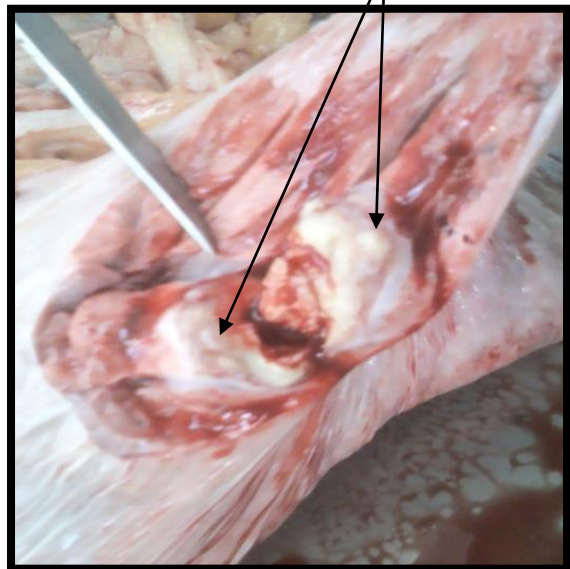


Figure 41 : Lésion caséuse au niveau du parenchyme des poumons.

V-4.2. Résultats de laboratoire

L'examen bactériologique a comporté deux étapes, en l'occurrence la culture et l'identification bactérienne.

V-4.2.1. Culture bactérienne

Les résultats de la mise en culture sont rapportés dans le **Tableau 11** et illustrés dans la Figure 42.

Tableau 11 : Résultats de la culture bactérienne

Abattoir	Positive		Négative	
	n	%	n	%
Bgayet (n=10)	0	0	10	100
Sétif (n=16)	0	0	16	100
Boufarik (n=26)	05	19,23	21	80,77
Mouzaia (n=28)	04	14,28	24	85,71
Médéa (n=14)	04	28,57	10	71,43
Total (n=94)	13	13,83	81	86,17

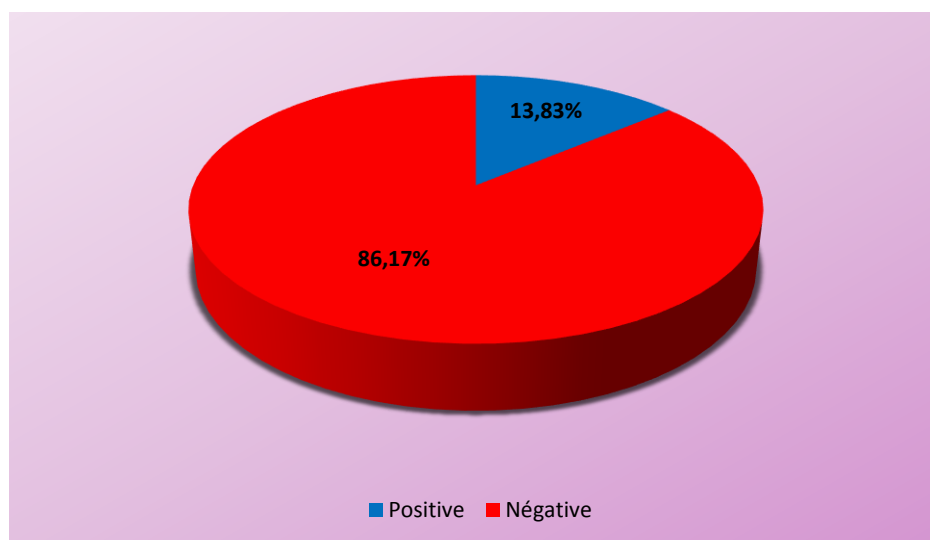


Figure 42 : Résultats de la culture bactérienne.

Sur 94 échantillons mis en culture, 13 cultures (13,83%) ont été obtenues dans le milieu de culture Löwenstein-Jensen, le milieu solide Middlebrook 7H10 et le milieu Coletsos (**Figure 43**).

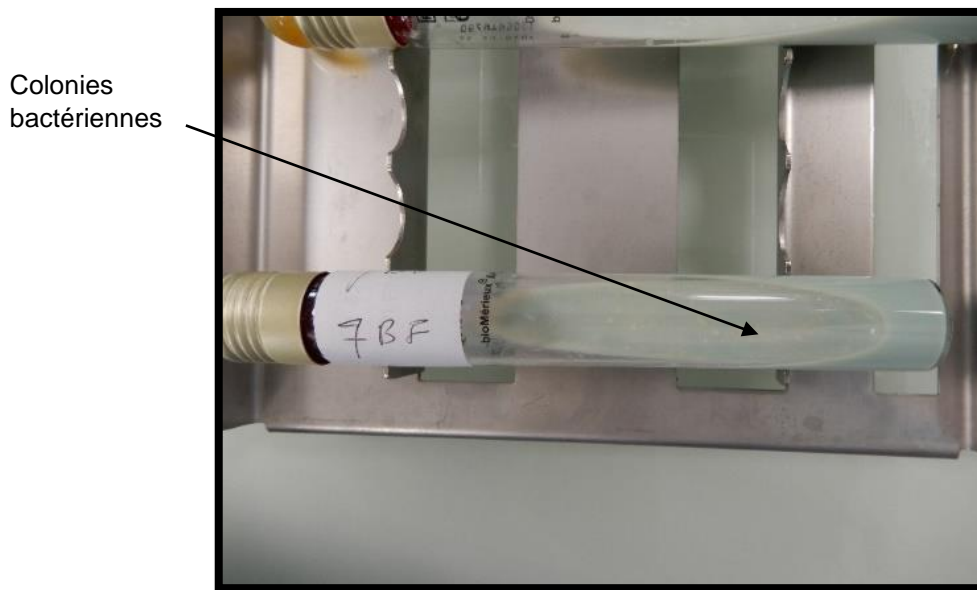


Figure 43 : Culture positive sur Coletsos

V-4.2.2. L'identification bactérienne

Ces cultures obtenues ont été identifiées sur le plan phénotypique puis moléculaire.

🔍 Identification moléculaire

La PCR-séquençage du gène *rpoB* a identifié ces 13 isolats comme étant le complexe *M. tuberculosis* (**Figure 44**). Aucune autre espèce mycobactérienne n'a été cultivée à partir de ces échantillons.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Mycobacterium tuberculosis strain FDAARGOS_756 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	99%	0.0	99.62%	4414577	CP054014.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain FDAARGOS_757 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4417931	CP054013.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain 4860 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4394156	CP053092.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain RW-TB008 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4379910	CP048071.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain 5005 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	99%	0.0	99.62%	4418311	CP049108.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain TCDC11 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4418417	CP046728.2
✓	Mycobacterium tuberculosis strain TCDC3 chromosome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4413983	CP047258.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain TCDC7 chromosome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4641184	CP047163.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain TCDC10 chromosome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4419577	CP047164.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain SIT745/FAI1-MYS chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4414742	CP046529.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain A06.RNA polymerase beta subunit (rpoB).gene partial cds	Mycobacterium tuberculosis	972	972	99%	0.0	99.62%	711	MN901274.1
✓	Mycobacterium tuberculosis variant bovis BCG strain BCG SL 222 Sofia chromosome compl...	Mycobacterium tuberculosis vari...	972	972	100%	0.0	99.44%	4370706	CP064405.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain 1-0006P6C4 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4419608	CP041876.1
✓	Mycobacterium tuberculosis strain 1-0009P6C4 chromosome complete genome	Mycobacterium tuberculosis	972	972	100%	0.0	99.44%	4418159	CP041874.1

Figure 44 : Résultats du Blast (souche du complexe *M. tuberculosis*).

Par la suite, le séquençage supplémentaire du génome entier a identifié plus précisément tous les 13 isolats comme *M. bovis*.

Les résultats relatifs à l'identification moléculaire sont rapportés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Résultat de PCR RpoB et Séquençage génome complet.

Abattoirs	PCR RpoB	Séquençage génome complet
Bgayet (n=0)	/	/
Sétif (n=0)	/	/
Boufarik (n=05)	5 souches du complexe <i>M. tuberculosis</i>	Les 5 souches sont <i>M. bovis</i>
Mouzaia (n=04)	4 souches du complexe <i>M. tuberculosis</i>	Les 4 souches sont <i>M. bovis</i>
Médéa (n=04)	4 souches du complexe <i>M. tuberculosis</i>	Les 4 souches sont <i>M. bovis</i>
Total (n=13)	13 souches du complexe <i>M. tuberculosis</i>	Les 13 souches sont <i>M. bovis</i>

Toutes les souches du complexe *M. tuberculosis* ont été identifiées précisément par le séquençage supplémentaire du génome entier comme des souches de *M. bovis* dont 5 souches (5/13 ; 38,46%) à l'abattoir de Boufarik, 4 souches (4/13 ; 30,77%) à Mouzaia et 4 souches (4/13 ; 30,77%) à Médéa (**Figure 45**).

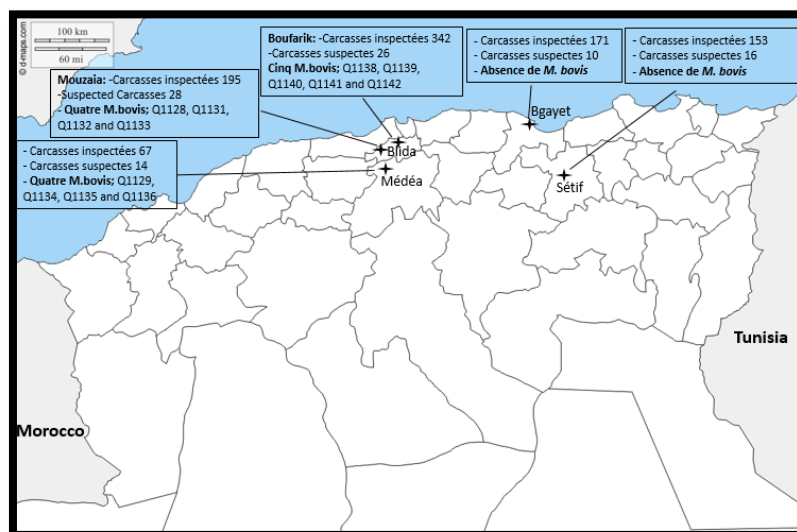


Figure 45 : Répartition des souches de *M.bovis* sur les cinq abattoirs.

Les résultats de la répartition des souches de *M. bovis* sur les organes sont rapportés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Répartition des souches de *M. bovis* sur les organes.

N° du prélèvement	N° de CSUR	Localisation	Abattoir	Provenance
2M	Q1128	Ggl TB-Appareil respiratoire	Mouzaia	Inconnu
6'	Q1129	Ggl Med-Appareil respiratoire	Médéa	Inconnu
8M	Q1131	Ggl TB-Appareil respiratoire	Mouzaia	Inconnu
11M	Q1132	Ggl inspecteur-Appareil respiratoire	Mouzaia	Inconnu
12M	Q1133	Ggl Med-Appareil respiratoire	Mouzaia	Inconnu
1MD	Q1134	Ggl Med-Appareil respiratoire	Médéa	Inconnu
2MD	Q1135	Ggl Med-Appareil respiratoire	Médéa	Inconnu
5MD	Q1136	Ggl rétro-pharg-Tête	Médéa	Inconnu
1/1 BF	Q1138	Ggl TB-Appareil respiratoire	Boufarik	Bouinan
2/2 BF	Q1139	Ggl Tb-Appareil respiratoire	Eucalyptus	Eucalyptus
3/1 BF	Q1140	Ggl apical-Appareil respiratoire	Boufarik	Mouzaia
6BF	Q1141	Ggl Med-Appareil respiratoire	Boufarik	Bouira
7Bf	Q1142	Ggl Med-Appareil respiratoire +ggl hépatique-Foie	Boufarik	Eulma

Ggl : ganglion, TB : trachéo-branchique, Med : médiastinal, rétro-pharg : rétropharyngien.

Toutes les souches (n=13 ; 100%) de *M. bovis* confirmées par l'analyse du génome complet étaient isolées à partir des ganglions. Parmi ces 13 souches, 11 (84,61%) sont localisées au niveau respiratoire, une souche (7,67%) au niveau de la tête et une autre souche (7,67%) avait une localisation respiratoire et hépatique au même temps.

V-4.2.3. Analyse de typage pan-génomique

En outre, le WGS a affiné l'identification des 13 isolats en tant que *M. bovis*. Auparavant, les travaux de Loiseau *et al.* ont indiqué que la diversité de *M. bovis* en Afrique a été sous-estimée, après leur découverte de nouveaux complexes clonaux sur le continent (Loiseau *et al.*, 2020). La comparaison génomique des isolats algériens de *M. bovis* avec ceux examinés dans les travaux de Loiseau *et al.* (2020) a indiqué quatre complexes clonaux différents de *M. bovis* en Algérie, dont trois étaient ceux récemment découverts et un était connu auparavant, le complexe clonal Eu2 que l'on trouve couramment en Europe occidentale. Plus précisément, nous avons trouvé six isolats, à savoir Q1128, Q1131, Q1135, Q1138, Q1139 et Q1142, qui ont été regroupés avec des souches cliniques de référence du complexe clonal de *M. bovis*-

Unknown2. Un isolat, Q1134, était lié au complexe clonal de *M. bovis*-Unknown7 ; un isolat, Q1140, était apparenté au complexe clonal de *M. bovis*-Inconnu4 ; trois isolats, Q1141, Q1129 et Q1136, appartenaient au complexe clonal de *M. bovis*-Europe 2 ; et il y avait un nouveau clone pour deux isolats, Q1132 et Q1133, qui n'appartenaient à aucun des complexes clonaux identifiés par Loiseau *et al.* (2020). Sur la base des données disponibles pour 3364 isolats cliniques de *M. bovis* (Loiseau *et al.*, 2020), les pays Africains autres que l'Algérie comprenaient l'Éthiopie, le Malawi, l'Érythrée, le Maroc, la Tunisie et l'Afrique du Sud. Les pays européens comprenaient le Royaume-Uni, la Suisse, la Suède, l'Espagne, la France, l'Italie, l'Allemagne, les Pays-Bas et la Belgique. Les pays Américains comprenaient les États-Unis, le Canada, le Brésil et le Mexique. Les pays Asiatiques comprennent le Liban. Les proportions de génotypes de *M. bovis* observées en Algérie étaient significativement différentes de celles observées dans les autres pays ($P < 0,001$), les autres pays Africains ($P = 0,045$) et les pays Américains ($P < 0,001$) mais ne différaient pas significativement des pays Européens ($p = 0,245$). En utilisant un seuil de 12 SNP pour détecter une transmission croisée potentielle (Yang *et al.*, 2017), nous avons détecté un groupe de transmission impliquant les isolats Q1132 et Q1133 présentant 215-SNP et 0-SNP après avoir supprimé des régions répétitives (**Figure 46**).

Tree scale: 0.01

Colored genotypes

- BOV_PZAsus
- BOV_African 2
- BOV_U2
- BOV_U3
- BOV_African 1
- BOV_U8
- BOV_Europe1
- BOV_U6
- BOV_U7
- BOV_U4
- BOV_U5
- BOV_Europe 2
- BOV_Other

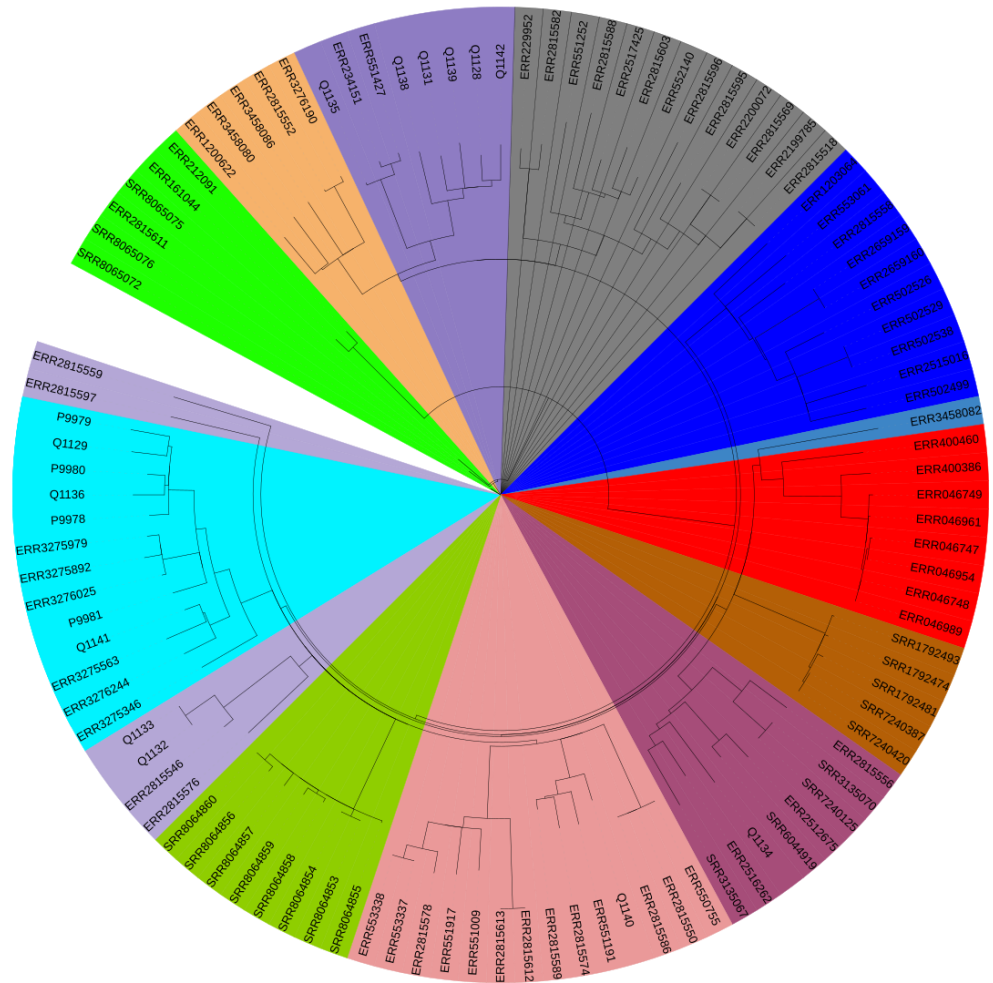


Figure 46 : Arbre phylogénétique de 105 séquences génomiques de *Mycobacterium bovis* basé sur 2.881 positions variables extraites à l'aide de MTBseq. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site polymorphe. L'arbre a été généré à l'aide des outils en ligne PhyML 3.0

V-5. DISCUSSION

La tuberculose est l'une des maladies d'origine infectieuses les plus dévastatrices qui sévit dans le monde entier (Dürr et *al.*, 2013). De nombreuses études ont été réalisées dans le but de bien connaître sa situation et de mettre en évidence les agents responsables chez l'homme et chez l'animal. Cette affection demeure à ce jour un problème d'actualité.

En Algérie, la tuberculose bovine est négligée vu l'absence de diagnostic biologique systématique et par conséquent la confirmation définitive de la maladie fait défaut. Aussi, peu d'études microbiologiques ont été rapportées pour confirmer sa présence dans les élevages et pour d'identifier les agents responsables (Sahraoui et *al.*, 2009). C'est pour cette raison que nous avons mené cette enquête dans cinq abattoirs de différentes régions du pays.

Notre étude est réalisée dans cinq abattoirs du pays et les cas tuberculose des bovins relevés ici ne présentent qu'un petit échantillon de ce qui se passe réellement dans nos abattoirs. Les résultats de la présente étude seront discutés par partie :

➤ **Abattoirs :**

Nous tenons à signaler que les conditions de travail dans certains abattoirs n'étaient pas parfaites et le protocole de contrôle des animaux abattus pour rechercher des lésions compatibles avec la tuberculose diffère d'un abattoir à l'autre. En outre, les informations limitées concernant les animaux abattus, telles que leur origine et leurs mouvements, limitent la possibilité de mener une étude épidémiologique spatiale sur la répartition de la tuberculose bovine. L'abattage illégal complique encore l'établissement d'une telle carte de la tuberculose bovine. Malgré les limites mentionnées ci-dessus, des informations contributives ont émergé de cette étude.

1. Les animaux abattus

Pour les animaux abattus, nous avons enregistré que le nombre des mâles ($n=617/928$; 66,5%) est significativement ($p < 10^{-4}$) supérieur à celui des femelles ($n=311/928$; 33,5%). Cela résulterait de la réglementation interdisant l'abattage des femelles sauf en cas de nécessité, comme en cas de la réforme, lors d'un abattage d'urgence ou abattage sanitaire. Cela pourrait être expliqué, aussi, par la demande du marché où le consommateur préfère la viande du veau

ou du taureau plutôt que la viande de la vache, en raison de la qualité organoleptique, jugée meilleure chez le mâle que chez la femelle.

Concernant l'âge des animaux abattus, nous avons constaté que la plupart des animaux abattus étaient âgés de <2 ans (n = 427/928 ; 46%), suivis par les animaux âgés de 2 à 5 ans (n = 399/928 ; 43%) et les animaux de plus de cinq ans (n = 102 / 928 ; 11%). Ce constat résulterait de l'excellente valeur organoleptique de la viande des jeunes animaux qui est très demandée. La plupart des animaux abattus étaient de poids moyen (score 2,5-3) (536/928 ; 57,75%), suivis des animaux maigres (score 1-2) (286/928 ; 30,81%) et les animaux dont l'état d'embonpoint est jugé gras (score 3.5-5) (106/928 ; 11,42%). Cela pourrait être expliqué par la demande du marché, où le consommateur préfère une viande qui contient une quantité raisonnable du gras (pas trop grasse).

2. Animaux porteurs de lésions macroscopiques suspectes de tuberculose

Dans les cinq abattoirs et durant les périodes cités précédemment, un ensemble de 928 carcasses bovines ont été inspectées, 94 carcasses étaient porteuses de lésions suspectes de tuberculose, soit une proportion de 10,13 % (IC 8,24-12,34%).

Ce pourcentage n'interprète pas la prévalence réelle de la tuberculose, et cela est dû au manque de la spécificité de l'inspection post mortem réalisée en routine. Cette inspection varie légèrement selon les pays, la sensibilité de cette inspection est difficile à évaluer avec précision (Sieng, 2011), car elle dépend fortement de l'abattoir avec notamment la vitesse de la chaîne d'abattage, l'éclairage et l'expérience du vétérinaire inspecteur (Frankena *et al.*, 2007 ; More & Good, 2006).

La prévalence de la tuberculose bovine, estimée à partir de l'inspection post mortem de routine réalisée sur bovins abattus, était de 10,13%. Ce taux est plus élevé que celui précédemment rapporté en Algérie en 2007 (3,6%) (Sahraoui *et al.*, 2009) et au Maroc en 2014-2015 (3,7%) (Yahyaoui-Azami *et al.*, 2007).

Dans d'autres pays Africains, la prévalence de la tuberculose bovine se situerait entre 0,0185% (n=37/200101) au Sénégal (Diagne, 2009) et 18,95% au Kenya (Gathogo *et al.*, 2012).

Ces chiffres ne sont que des estimations, car la sensibilité des inspections de routine pour le diagnostic de la tuberculose bovine varie de 29,4% à 55% (Teklu *et al.*, 2004, Corner *et al.*, 1990 ; Asseged *et al.*, 2004) ; cela est expliqué par le fait que les animaux porteurs latents ou ceux récemment infectés ont un nombre limité de mycobactéries dans un petit nombre de

tissus ou d'organes peuvent être porteurs de lésions microscopiques échappant à l'inspection de routine (Crawshaw *et al.*, 2008).

De plus, comme rapporté dans les travaux de Thorel (2003) la tuberculose bovine est souvent confondue avec quelques maladies fréquentes chez cette espèce (détails dans la page 84).

Aussi, chez certaines espèces, les lésions causées par *Yersinia pseudotuberculosis* ressemblent fortement à celles de *M. bovis* (Delahay *et al.*, 2007).

En terme de lésions suspectes, nous avons constaté qu'il y a une différence statistiquement significative ($p=0.001$) entre les abattoirs et nous pouvons conclure que l'abattoir de Médéa (20,9%) est le plus touché, par contre le moins touché est celui de Bgayet (5,84%).

Nous pouvons également comparer l'abattoir de Médéa avec le reste pour mieux conclure que c'est le plus touché (Test Khi2, 14/67 versus 80/861, $p=0.002$).

De la même manière, nous pouvons comparer celui de Bgayet avec le reste pour mieux conclure que c'est le moins touché (test Kh2, 10/171 versus 84/757, $p=0.04$).

Facteurs de variations : Les principaux facteurs de variation pouvant influencer l'apparition de la tuberculose sont :

Le sexe :

Par rapport au sexe, nos résultats montrent que les cas suspects de tuberculose sont significativement plus élevés ($p = 0,038$) chez les femelles que chez les mâles.

Cette observation pourrait être expliquée par la durée de vie productive plus longue chez les femelles durant laquelle ces dernières deviennent vulnérables face aux facteurs de stress notamment la gestation, la parturition et la lactation (Teklu *et al.*, 2004).

Nous concluons donc que le sexe a un effet sur la prévalence des lésions suspectes de tuberculose.

Des résultats similaires ont été obtenus par Terefe (2014) et Ahmad *et al.* (2017), lors de deux enquêtes réalisées dans des abattoirs en Ethiopie et au Nigeria respectivement, ces auteurs ont rapporté que les femelles étaient plus touchées que les mâles.

Par contre, ces résultats diffèrent de ceux rapportés par Teklu *et al.* (2004) et Demelash *et al.* (2009) qui ont indiqué qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux sexes et ils ont, donc, conclu que le sexe n'est pas un facteur de risque.

L'âge :

Concernant l'âge, nos résultats montrent que les cas suspects de tuberculose sont plus fréquents ($p < 10^{-4}$) chez les sujets âgés de plus de cinq ans avec une prévalence de 25,5%, suivis des jeunes animaux (<2 ans) avec 9,83%, puis des animaux adultes (2 à 5 ans) avec 6,51%. Statistiquement, cette différence entre les classes d'âge est significative. Cela pourrait être expliqué par la nature de la maladie qui est d'évolution chronique (Bénet et *al.*, 2016) et aussi, les risques d'exposition à la tuberculose augmentent avec l'âge (Gebrezgabiher et *al.*, 2014).

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Ahmad et *al.* (2017) et Gebrezgabiher et *al.*, (2014) qui indiquent que les lésions suspectes ont été rencontrées beaucoup plus chez les animaux âgés de plus de 6 ans. Ces auteurs ont pu l'expliquer par le fait qu'avec l'âge, les chances d'exposition à l'infection tuberculeuse sont augmentées.

Aussi, le système immunitaire s'affaiblit physiologiquement avec l'âge (Demelash et *al.*, 2009). De plus, la vieillesse et les facteurs du stress peuvent réactiver les infections latentes (Cleaveland et *al.*, 2007).

Un même constat a été fait par Demelash et *al.* (2009) lors d'une étude sur la tuberculose bovine réalisée dans cinq abattoirs en Ethiopie. Ces auteurs ont indiqué que les lésions tuberculeuses sont plus fréquemment rencontrées chez les animaux âgés (≥ 6 ans) et les jeunes (<2 ans) que dans le groupe d'âge moyen (2 à 6 ans). Ces mêmes auteurs ont expliqué l'atteinte des jeunes animaux par le développement de l'infection chez cette catégorie suite à l'exposition aux aérosols mais surtout à l'ingestion du lait infecté (Demelash et *al.*, 2009).

Cependant, ces résultats sont différents par rapport à ceux rapportés par Teklu et *al.* (2004) et Terefe (2014) qui indiquent qu'aucune différence statistiquement significative ($P > 0,05$) n'a été enregistrée entre les classes d'âge des animaux.

L'état d'embonpoint :

Pour les animaux suspects de tuberculose, nos résultats ont indiqué que les animaux de poids moyen ont été les plus touchés (60/536 ; 11,19%), suivis de ceux qui étaient maigres (31/286 ; 10,83%), puis des animaux gras (03/106 ; 2,83%). La différence entre les valeurs de prévalence était significative, $p = 0,03$. Ce qui s'explique potentiellement par le caractère amaigrissant de cette maladie (Terefe, 2014).

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Terefe (2014) qui indique que les animaux dont l'état d'embonpoint moyen sont plus touchés que les animaux gras. Cet auteur a expliqué ce constat par la nature amaigrissante de la maladie.

Un même constat a été fait par Asseged (2004), ces derniers ont rapporté que les lésions tuberculeuses sont rencontrées chez les animaux avec un score corporel moyen, suivis des animaux maigres puis les animaux gras.

Par ailleurs, lors d'une étude menée en Ethiopie, les résultats ont montré que les animaux dont l'état d'embonpoint est mauvais sont les plus susceptibles d'avoir des lésions tuberculeuses que ceux ayant un moyen et un bon état corporel (Gebrezgabiher et *al.*, 2014). Ces auteurs ont expliqué ce constat par le fait que les animaux ayant un bon état corporel ont un bon statut immunitaire qui leur confère une bonne protection contre les agents infectieux.

Néanmoins, Teklu et *al.* (2004) ont rapporté une absence de différence significative entre les différents score corporel.

Localisation des lésions :

Dans les quatre abattoirs de Bgayet, Sétif, Boufarik et Mouzaia, il ressort que les lésions suspectes de tuberculose sont exclusivement (100%) localisées dans la cage thoracique dont 96,25% (n=77/80) au niveau des ganglions lymphatiques de l'appareil respiratoire et 3,75% (n=3/80) au niveau du parenchyme pulmonaire.

A l'abattoir de Médéa, nous avons remarqué une prédominance ganglionnaire (90,47%, n=19/21) dont 68,42% (n=13/19) des lésions au niveau des ganglions thoraciques.

Ce même constat a été fait par Gebrezgabiher et *al.* (2014) qui ont rapporté que la majorité des lésions évocatrices de tuberculose (75%) ont été retrouvées dans le poumon et ses ganglions lymphatiques associés et par Asseged et *al.* (2004) qui ont indiqué que ces lésions sont retrouvées fréquemment (43,6%) dans les nœuds lymphatiques de la cage thoracique.

Cette prédominance thoracique pourrait être expliquée par le mode de transmission de la maladie, qui est respiratoire. Cette voie est considérée comme la principale voie d'infection et de transmission de la maladie (Gebrezgabiher et *al.*, 2014), par aérosols contenant des bacilles et passant immédiatement d'un animal excréteur à un autre sain (Yahyaoui-Azami et *al.*, 2017).

Laboratoire :

Dans le but de confirmer ou d'infirmer la présence de la tuberculose dans ces abattoirs, nous avons traité les cas suspects de tuberculose par examen bactériologique qui comporte les étapes suivantes :

- ✓ La culture bactérienne ;
- ✓ L'identification.

Culture bactérienne :

Nous avons procédé directement à la culture sans passer par l'examen direct car la culture est plus sensible que l'examen bacilloscopique (Proaño-Pérez et *al.*, 2011).

Pour la culture bactérienne, nous avons obtenu un pourcentage de 13.83% de cultures positives contre 86.17% négatives.

Ce faible taux de positivité de la culture pourrait être expliqué par le fait que les mycobactéries sont mortes, détruites lors de leur manipulation (allongement du temps de la décontamination) ou encore les bactéries présentes ne sont pas de mycobactéries (Cissé et *al.*, 2008) ou par la présence d'un autre genre appartenant aussi à l'ordre des actinomycétales, tel que *Nocardia* (Teklu et *al.*, 2004) ; ou encore par l'absence de mycobactéries viables dans des lésions initiales complètement calcifiées (Asseged et *al.*, 2004).

Nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Cissé et *al.* (2008), et par Proaño-Pérez et *al.* (2011) qui ont obtenu un taux de culture de 54,80% et 36,4%, respectivement.

Identification moléculaire

RpoB : ce système de PCR-séquençage permet d'identifier les espèces de mycobactéries mais il ne permet pas de distinguer entre les espèces du complexe *M. tuberculosis*.

Séquençage du génome entier (WGS)

Quant à la structure de la population de *M. bovis* chez les bovins Algériens, une précédente enquête de spoligotypage réalisée en 2007 dans deux abattoirs a révélé 22 profils avec 89% d'isolats présentant des spoligotypes déjà signalés dans des souches bovines européennes (Sahraoui et *al.*, 2009).

Dans notre étude, WGS a révélé la présence de quatre génotypes différents de *M. bovis* et d'un nouveau génotype en Algérie contre 12 génotypes rapportés par Loiseau et *al.* (2020).

Nous avons détecté deux isolats présentant un motif WGS étroitement lié, suggérant que ces deux isolats, Q1132 et Q1133, provenaient du même clone de *M. bovis*. Ces deux isolats ont été isolés du même abattoir (Mouzaia à Blida).

Sans surprise, ces données illustrent la propagation transfrontalière de *M. bovis* et le fait que l'Algérie importe régulièrement des bovins vivants d'Europe, notamment de France et d'Espagne, fournissant chacun 40.000 têtes de bétail par an (Chougar et *al.*, 2019, Ministry of Agriculture, Food and Environment of Spain, 2017). Ces données indiquent qu'une partie de l'épidémiologie de la tuberculose bovine chez les bovins en Algérie est induite par les mouvements transfrontaliers d'animaux.

Cependant, le peu d'informations sur les animaux abattus, comme leur origine et leurs déplacements, limite la possibilité de réaliser une étude épidémiologique spatiale sur la répartition de la tuberculose bovine. L'abattage illégal complique encore l'établissement d'une telle carte de la tuberculose bovine en Algérie. De plus, seuls 13 isolats de *M. bovis* étaient disponibles pour cette toute première analyse WGS de *M. bovis* animal en Algérie. Un échantillon aussi petit est susceptible de sous-estimer la diversité des agents pathogènes en Algérie et est donc peu susceptible d'établir des liens épidémiologiques entre les cas.

Enfin, malgré les limites signalées ci-dessus, cette étude fondatrice basée sur le WGS en Algérie indique la contribution du WGS au traçage des isolats animaux de *M. bovis* dans ce pays. Cette étude suggère qu'il serait intéressant d'établir une base de données nationale algérienne de *M. bovis* WGS pour retracer les sources d'infection, y compris le rôle potentiel de l'importation transfrontalière et de la faune sauvage, comme rapporté dans d'autres pays comme le Royaume-Uni (Pavlik et *al.*, 2002 ; Krajewska-Wędzina et *al.*, 2020), et la transmission croisée dans les fermes. D'autres comparaisons entre les isolats humains (Tazerart et *al.*, 2021) et animaux aideraient également à retracer les sources de la tuberculose zoonotique à *M. bovis* chez les patients dans une perspective de prévention médicale.

Étant donné un si petit nombre d'isolats, cette analyse pourrait être très biaisée, et un plus grand nombre d'isolats étudiés peut fournir des similitudes avec d'autres emplacements. Cela indique que la poursuite des recherches dans ce domaine est nécessaire.

Malgré cette limitation, nous avons trouvé des similitudes avec les nations Européennes, ce qui est cohérent avec l'importation de bétail en Algérie depuis l'Europe et les liens historiques entre ces régions.

CONCLUSION

La tuberculose bovine est une zoonose majeure responsable de sérieux problèmes en santé publique.

La présente enquête est une contribution à l'étude de la tuberculose bovine dans ces abattoirs de l'Algérie. Elle a pour but d'évaluer la prévalence de la tuberculose bovine, d'identifier et de caractériser sur le plan moléculaire, notamment basée sur le séquençage du génome complet, les espèces mycobactériennes incriminées. Les résultats de cette enquête ont permis de mettre en évidence :

- la présence de lésions suspectes de tuberculose avec une prévalence de 10,13% (94/928) des carcasses inspectées dans cinq abattoirs et seulement 13(13,83%) des lésions suspectées d'être tuberculeuses cultivaient *M. bovis*.
- les agents responsables en utilisant la culture, couplée à une identification phénotypique puis moléculaire ;
- La faible prévalence de la tuberculose bovine dans les cinq abattoirs qui est de 1,4% (13/928).

Donc, notre enquête a pu confirmer l'existence de la maladie dans 3/5 de ces abattoirs et a permis la mise en évidence de *M. bovis* sur des carcasses présentant des lésions.

Cette étude fondatrice basée sur le WGS en Algérie indique la contribution du WGS au traçage des isolats animaux de *M. bovis* en Algérie, où l'épidémiologie de la tuberculose bovine chez les bovins est en partie déterminée par les mouvements transfrontaliers d'animaux et de produits animaux.

Enfin, à l'aide du séquençage du génome complet (WGS), cette étude a fourni, pour la première fois, une meilleure compréhension de la situation de la tuberculose bovine dans différents abattoirs du territoire Algérien.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Malgré la faible prévalence de la tuberculose des bovins, il ne faut pas la sous-estimer, vue l'aspect zoonotique de la maladie et sa transmission entre les espèces.

En matière de la prophylaxie et de la lutte, à laquelle il faut donner beaucoup d'importance, nous incitons à :

- L'identification de tout le cheptel bovin au niveau national pour mieux contrôler son déplacement.
- L'inspection approfondie des carcasses qui peut révéler l'existence des lésions tuberculeuses.
- Renforcer la surveillance au sein des abattoirs et localiser l'origine des porteurs de lésions afin d'identifier des zones et des élevages infectés.
- Renforcer et élargir le dépistage de la tuberculose bovine sur le terrain et l'abattage sanitaire pour les cas déclarés positifs.
- Désinfection et aménagement hygiénique des étables infectées.
- Confirmation ou infirmation des lésions suspectes au niveau du laboratoire.
- Faire savoir aux personnels des abattoirs et aux éleveurs le danger de la tuberculose et ces différents aspects de transmission.
- Mieux sensibiliser la population, par rapport, à la gravité de cette maladie et aux dangers de l'abattage clandestin. Aussi, au danger qu'apporte la consommation du lait cru.
- Sensibiliser les éleveurs à propos de cette zoonose et augmenter les indemnités.

Durant notre travail, nous n'avons ciblé que cinq abattoirs, nous préconisons que d'autres enquêtes soient initiées pour parfaire nos connaissances épidémiologiques sur cette maladie ;

- Elargir l'échantillon sur la totalité du territoire national.

- Identification et caractérisation moléculaire des souches isolées.
- Cette étude suggère qu'il serait intéressant d'établir une base de données nationale algérienne de *M. bovis* WGS pour retracer les sources d'infection, y compris le rôle potentiel de l'importation transfrontalière et de la faune sauvage.
- Étant donné un si petit nombre d'isolats, cette analyse pourrait être très biaisée, et un plus grand nombre d'isolats étudiés peut fournir des similitudes avec d'autres emplacements. Cela indique que la poursuite des recherches dans ce domaine est nécessaire.

CHAPITRE VI : Enquête 3

Génotypage des lignées de *Mycobacterium tuberculosis* circulant chez l'homme en Algérie (la région Centre).

VI-1. INTRODUCTION

La tuberculose reste un problème de santé publique en Algérie (M.S.P.R.H, 2011, Nacef et *al.*, 2015), où son incidence en 2017 était estimée entre 53 et 88 cas pour 100 000 habitants (Bouziane et *al.*, 2019). Cependant, ces chiffres ne sont que des estimations car en Algérie, le diagnostic de la tuberculose repose principalement sur l'examen microscopique des échantillons cliniques et dans la plupart des laboratoires de lutte antituberculeuse, l'isolement et la culture des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* en cause, ne sont pas effectués. A titre d'exemple dans la région de Bgayet, un seul des huit Services de Contrôle de la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (S.C.T.M.R.) répartis dans huit communes, est doté de capacités de culture. De plus, dans le cas où la culture est réalisée, *M. tuberculosis* est identifié de façon présomptive sur la base de la morphologie de la colonie et le moment de son apparition. Ce protocole de laboratoire ne permet pas de confirmer fermement la tuberculose, ni d'identifier les espèces mycobactériennes impliquées et ne donnent aucune information sur les génotypes en circulation.

En conséquence, il y a un manque de connaissance des souches circulantes du complexe *M. tuberculosis* en Algérie. Cette situation est dommageable car l'identification précise de l'isolat au sein du complexe *M. tuberculosis* présente un intérêt médical pour orienter les investigations sur les sources de contamination et pour organiser la prévention secondaire, comme dans le cas de la tuberculose zoonotique due à *M. bovis*; et d'instaurer un traitement antibiotique approprié, en tenant compte de la résistance naturelle de *M. bovis* au pyrazinamide antimycobactérien de première intention (Djelouadji et *al.*, 2008, Nakajima et *al.*, 2010).

Ainsi, les objectifs de la présente étude étaient de confirmer les cas de tuberculose obtenus en culture dans cinq wilayas d'Algérie, de distinguer les espèces mycobactériennes au sein du complexe *M. tuberculosis* et de définir les lignées de *M. tuberculosis* circulant en Algérie.

VI-2. Cadre de l'étude

La collecte des échantillons de cette présente étude a été réalisée au niveau des Services de Contrôle de la Tuberculose et des Maladies Respiratoires (S.C.T.M.R.) appartenant à des Etablissements Publics de Sante de Proximité (E.P.S.P.).

VI-2.1. Lieu et période de l'étude

La présente étude consiste en une enquête prospective, à visée descriptive, sur l'identification des isolats présumés identifiés comme le complexe *M. tuberculosis*, de distinguer les espèces mycobactériennes au sein du complexe *M. tuberculosis* et de définir les lignées de *M. tuberculosis* circulant en Algérie.

Des isolats cultivés sur milieu Löwenstein-Jensen et présumés identifiés comme le complexe *M. tuberculosis* sur la base de l'aspect des colonies et du moment de leur apparition entre 2015 et 2018 ont été collectés dans cinq SCTMR situés dans cinq départements en Algérie, à savoir les départements du Bgayet (période de collecte, 2015-2018), Tizi-Ouzou (2016), Médéa (2016-2018), Ain Defla (2018) et Blida (2018). La distance entre ces abattoirs a été estimée à 33 km au minimum (Blida / Médéa) et à 385 km au maximum (Bgayet / Ain Defla) (**Figure 47**).

Choix des S.C.T.M.R.

Le choix de ces S.C.T.M.R. a été justifié par :

- ✓ Leurs accessibilités et l'accord des responsables de ces services pour participer à cette étude.
- ✓ Le fait que ces cinq S.C.T.M.R. sont dotés de culture.

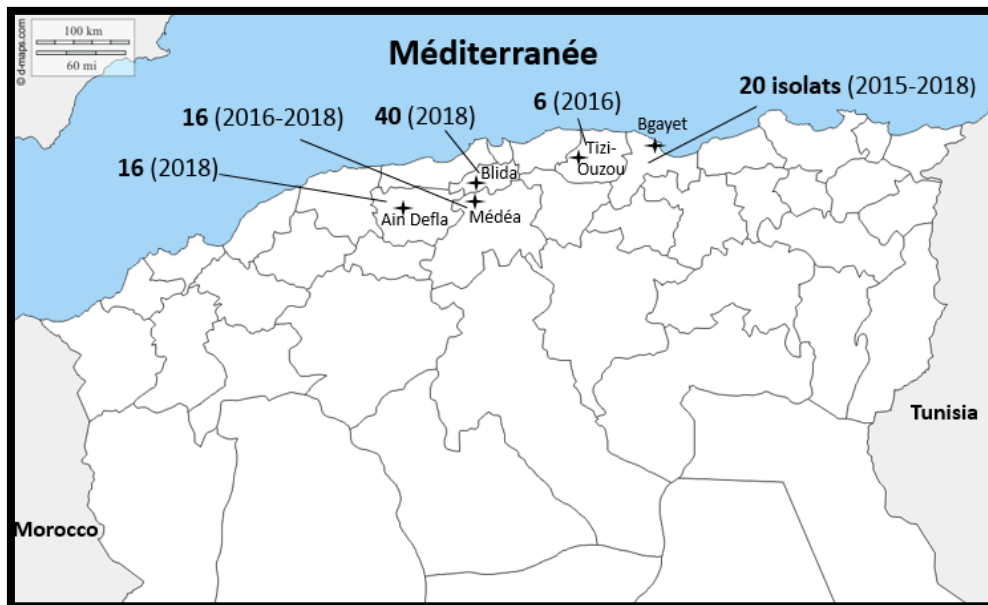


Figure 47 : Distribution des cinq S.C.T.M.R. localisés dans cinq wilayas dans le nord Algérien

Ces isolats appartenait à des patients habitant dans les départements respectifs ou parfois ils provenaient des départements voisins.

Les caractéristiques des patients, notamment le sexe, l'âge, la date du diagnostic et l'origine géographique, ont été obtenues en consultant les registres de laboratoire où ces informations ont été automatiquement enregistrées après anonymisation.

Laboratoire

Les isolats collectés ont été traités à l'Institut Hospitalier Universitaire, Méditerranée Infection de Marseille (France).

VI-3. MATERIEL et METHODES

VI-3.1. Matériel

VI-3.1.1. Au niveau des SCTMR :

Nous avons récupéré le matériel biologique et consulté des registres ;

Matériel biologique : nous avons pu avoir des isolats cultivés sur milieu Löwenstein-Jensen appartenait à 98 patients repartis sur les cinq SCTMR.

Matériel non-biologique : une consultation des registres des cinq SCTMR a été réalisée.

VI-3.1.2. Au niveau de laboratoire :

Nous avons utilisé le matériel de la biologie moléculaire qui sera décrit dans la partie méthodes.

VI-3.2. Méthodes

VI-3.2.1. SCTMR :

Collecte et acheminement des prélèvements

Nous avons récupéré des isolats cultivés sur milieu Löwenstein-Jensen (**Figure 48**).

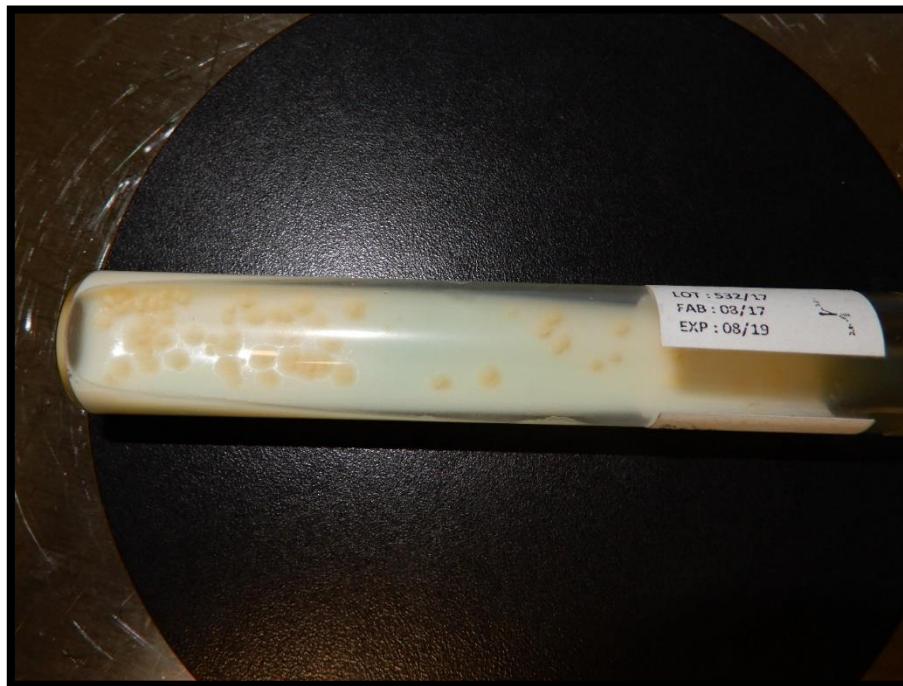


Figure 48 : Colonies de tuberculose sur Löwenstein-Jensen.

Ces isolats sont présumés identifiés comme le complexe *M. tuberculosis* sur la base de l'aspect des colonies et du moment de leur apparition.

Chaque tube porte un numéro attribué par les laborantins des SCTMR, ce même numéro, rapporté sur le registre, contient des informations relatives à un patient donné (le nom, le sexe, l'âge, adresse etc) et celles relatives à l'isolat comme la nature du prélèvement.

Ces prélèvements ont été transportés dans un emballage réglementaire estampillé UN 2814 correspondant au transport de matériel biologique de catégorie A et à une température ambiante au laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (BSL3) de l'Institut Hospitalier Universitaire (IHU) - Méditerranée Infection, Marseille, France où ils ont été analysés.

VI-3.2.2. Laboratoire :

À leur arrivée à l'Institut Hospitalo-Universitaire, les tubes de culture ont été mis dans le laboratoire de NSB 3 ; où ils ont été gardés dans leur emballage de transport et placés à une température de +4°C.

VI-3.2.2.1. Identification des isolats

Toutes les manipulations ont été faites sous un poste de sécurité microbiologique (PSM).

À partir du milieu de Löwenstein-Jensen, deux à cinq colonies qui ont été récupérées à l'aide d'une pipette, puis dissoutes dans un tube Eppendorf contenant 500 µL de solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (DPBS; Gibco, Paisley, UK), cette suspension est mélangée à l'aide d'un vortex.

Une quantité de 100 µL de cette suspension a été repiquée dans un milieu Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, États-Unis).

En parallèle, 200 µL de la suspension ont été inactivés à 100°C pendant une heure à l'aide d'un bain sec (Figure 24, page 104).

Une fois inactivées, les bactéries peuvent être sorties du P3 et manipulées dans le laboratoire de niveau de biosécurité 2 (NSB 2) dans lequel nous avons procédé à une extraction d'ADN, à une réalisation d'une série de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et enfin à une analyse de la séquence du génome entier dans le but d'identifier les isolats.

L'ADN total a été extrait en vortexant la suspension avec de la poudre de verre (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en utilisant un appareil FastPrep (MP Biomedicals, Santa Ana California, USA) suivi d'un kit Qiagen (Qiagen, Courtaboeuf, France) comme décrit précédemment (Angelakis et *al.*, 2009) (voir les détails page 104).

L'ADN extrait est récupéré puis conservé à -20°C ou +4°C pour une réalisation ultérieure de séries de PCR.

Polymerase Chain Reaction

Ensuite, une analyse exacte de répétition en tandem D (ETR-D) a été réalisée pour confirmer le complexe *M. tuberculosis* et l'identification au niveau de l'espèce comme décrit précédemment (GTTGATCGAGGCCTATCACG et GAATAGGGCTTGGTCACGTA) (Djelouadji et al., 2008).

Le locus ETR-D est composé d'un nombre variable de répétitions en tandem de 77 pb (Ignatova et al., 2006) avec un motif spécifique à l'espèce. Les isolats avec deux ou cinq copies d'unités répétées en tandem de 77 pb et un polymorphisme nucléotidique unique (SNP) T / G à la cinquième base de la répétition en tandem, en plus d'une unité répétée de 53 pb, ont été identifiés comme *M. tuberculosis* (Djelouadji et al., 2008), et les isolats avec trois copies d'une unité répétée de 77 pb et une unité répétée de 53 pb ou avec quatre copies d'une unité répétée de 77 pb et une unité répétée de 53 pb ont été identifiés comme *Mycobacterium africanum* type I ou *M. bovis*, respectivement (Djelouadji et al., 2008, El Khéchine et Drancourt, 2011).

Pour cela, nous avons d'abord procédé à une reconstitution et dilution des amorces ETR-D (voir les détails page 106).

Nous avons suivi le programme de PCR standard du système ETR-D (Djelouadji et al., 2008): dénaturation à 95°C pendant 15 min, [dénaturation à 95°C pendant 30sec, hybridation à 58°C pendant 30sec, élongation à 72°C pendant 1min] X 34 cycles, élongation finale à 72°C pendant 5 min. Par la suite, nous avons procédé à PCR-séquençage comme précédemment décrit.

VI-3.2.2.2. Génotypage des isolats de *M. tuberculosis*

Les lignées de *M. tuberculosis stricto sensu* ont été déterminées par analyse de polymorphisme à grande séquence en utilisant le séquençage par PCR des régions génomiques RD105, RD239 et RD750 et du gène de polykétide synthase pks15/1 comme décrit précédemment (Gagneux et al., 2006).

Nous avons d'abord caractérisé le gène pks15/1. Les isolats ne présentant aucune délétion dans le gène pks15 ont été identifiés comme étant *M. tuberculosis* lignée 1 (lignée Indo-Océanique = la lignée est-africaine-indienne), *M. tuberculosis* lignée 2 (Beijing) ou *M. tuberculosis* lignée 3 (Asie centrale) (Marmiesse et al., 2004 ; Zenteno-Cuevas et al., 2013).

Les isolats présentant une délétion de 7 pb aux positions 152 à 158 dans ce gène ont été génotypés comme la lignée Euro-Américaine *M. tuberculosis* (lignée 4) (Gagneux et *al.*, 2006, Gagneux, et *al.*, 2007, Zenteno-Cuevas et *al.*, 2013, Omae et *al.*, 2017, Chen et *al.*, 2018, Tram et *al.*, 2018).

Les isolats présentant une délétion de 6 pb aux positions 159 à 164 ont été identifiés comme *M. bovis*, *Mycobacterium microti* ou *M. africanum* (Marmiesse et *al.*, 2004).

Pour cela, nous avons suivi le programme de PCR standard du système pks15/1 : dénaturation à 95°C pendant 15 min [dénaturation à 95°C pendant 30sec, hybridation à 62°C pendant 30sec, élongation à 72°C pendant 1min 30 sec] X 35 cycles, élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Les isolats ont ensuite été testés pour différencier les lignées 1, 2 et 3 en utilisant la PCR pour détecter les délétions de RD105, RD239 ou RD750. Ces RD ont été amplifiés par PCR et soumis à une électrophorèse sur des gels d'agarose à 1,5%.

Préparation d'un gel d'agarose 1.5% (Manuel IHU, 2017).

- Mettre 3 g d'agarose dans une bouteille en verre.
- Ajouter, à ces 3g d'agarose, 200 ml de Tampon TBE 0.5X.
- Mettre la bouteille dans un micro-onde sans bouchon, pour faire fondre la préparation.
- Mélanger doucement.
- Verser la préparation dans un falcon de 50 mL.
- Ajouter le Sybr Safe sous la hotte.
- Mélanger doucement et couler dans le support.
- La polymérisation se fait en 10 à 15 minutes à température ambiante.
- Le gel polymérisé peut se conserver 24h au réfrigérateur (+ 4°C), enveloppé dans du parafilm et du papier blanc.

Electrophorèse et révélation (Manuel IHU, 2017).

- Oter le peigne et immerger le gel et son support dans la cuve de migration qui contient le tampon TBE 0.5X.
- Mélanger 6 µL de produit de PCR avec 2 µL de bleu de charge (Blue juice loading buffer).

- Récupérer et déposer 6 μL de ce mélange dans un puits. Faire de même pour chaque échantillon.
- Déposer 2.5 μL , sans ajout de bleu de charge, du marqueur de poids moléculaire VI.
- Puis, procéder à la migration à 135 volts pendant 20 min.
- Enfin, la lecture de l'électrophorèse se fait sous un transilluminateur UV.

Les isolats présentant la délétion dans RD105 ont été identifiés comme la lignée 2 de *M. tuberculosis* (lignées d'Asie de l'Est et de Beijing), les isolats présentant une délétion dans RD239 ont été identifiés comme la lignée 1 de *M. tuberculosis* (lignée Indo-Océanique) et les isolats présentant une délétion dans RD750 ont été identifiés comme *M. tuberculosis* lignée 3 (lignée d'Asie centrale) (Narayanan et al., 2008, Tram et al., 2018, Zachariah et al., 2017, Omae et al., 2017, Coll et al., 2014).

Plus tard, les génomes complets des isolats ont été séquencés pour une identification définitive.

 **Préparation Plaque de Séphadex et purification de la réaction de séquence** (Voir les détails pages 109 et 110).

Les résultats seront récupérés dans une clé USB puis analysés par le logiciel *ChromasPro version 1.7.7* (2015), Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia. Après avoir corrigé les séquences, ces dernières sont comparées aux séquences déjà existantes dans la base de données NCBI sur le site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

VI-3.2.2.3. Analyses de la séquence du génome entier

L'ADN total a été extrait de chaque isolat en utilisant une matrice InstaGene™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

L'ADN extrait a été quantifié par un test Qubit avec un kit haute sensibilité (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Un total de 0,2 μg / μL d'ADN a été séquencé par des analyses Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, USA).

L'ADN a été fragmenté et amplifié par PCR limitée (12 cycles), qui a introduit des codes-barres à double index et des adaptateurs de séquençage.

Après purification avec des billes AMPure XP (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA), les librairies ont été normalisées et regroupées pour séquençage sur la plateforme MiSeq. Le séquençage par paires et la génération automatisée de cluster avec des lectures à double index 2 × 250 pb ont été effectués.

L'outil en ligne TGS-TB (Total Genotyping Solution for *M. tuberculosis*) a été utilisé pour l'identification des lignées et des sous-lignages à l'aide du script KvarQ (Steiner et al., 2014). Les résultats de l'identification ont été soutenus par d'autres outils, tels que TB Profiler et Mykrobe Predictor-TB (Coll et al., 2015, Coll et al., 2014). Un pipeline de pangenome rotatif dans le logiciel Galaxy ([https://usegalaxy.org.au./](https://usegalaxy.org.au/)) a été utilisé pour récupérer le génome de base de quatre souches de *M. bovis*.

De plus, les sites SNP (Page et al., 2016) ont été utilisés pour détecter le nombre de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) au niveau du génome central.

Analyses statistiques

Les données collectées ont été analysées à l'aide des logiciels SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 23.0) et Microsoft Office Excel. Comme critère, les indicateurs de différences de fiabilité ont utilisé le profil $p < 0,05$. Les différences statistiques ont été évaluées par le chi-carré de Pearson ou les tests exacts de Fisher en tant que variables catégoriques. Les présentations graphiques ont été effectuées à l'aide de Microsoft Office Excel 2013.

Pour l'assemblage et analyse des électrophérogrammes obtenus, nous avons utilisé le logiciel ChromasPro (*ChromasPro 2015 version 1.7.7*, Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) puis nous les avons comparés à ceux disponibles dans la base de données GenBank par NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

VI-4. RESULTATS

VI-4.1. Population étudiée

Au cours de la période d'étude, cinq S.C.T.M.R. nous ont confié un total de 98 isolats préalablement cultivés sur milieu Löwenstein-Jensen et prélevés sur 98 patients.

VI-4.2. Facteurs de variations

Nous avons procédé à l'identification des patients, où nous avons pris en considération deux facteurs à savoir le sexe et l'âge.

✚ Sexe :

Dans cette étude, nous avons rapporté que les hommes ($n = 56$; $57,14 \pm 5,03$ %) étaient significativement plus touchés que les femmes ($n = 42$; $42,85 \pm 5,03$ %) ($p = 0,004$), avec un sex-ratio (H / F) de 1,33 (**Figure 49**).

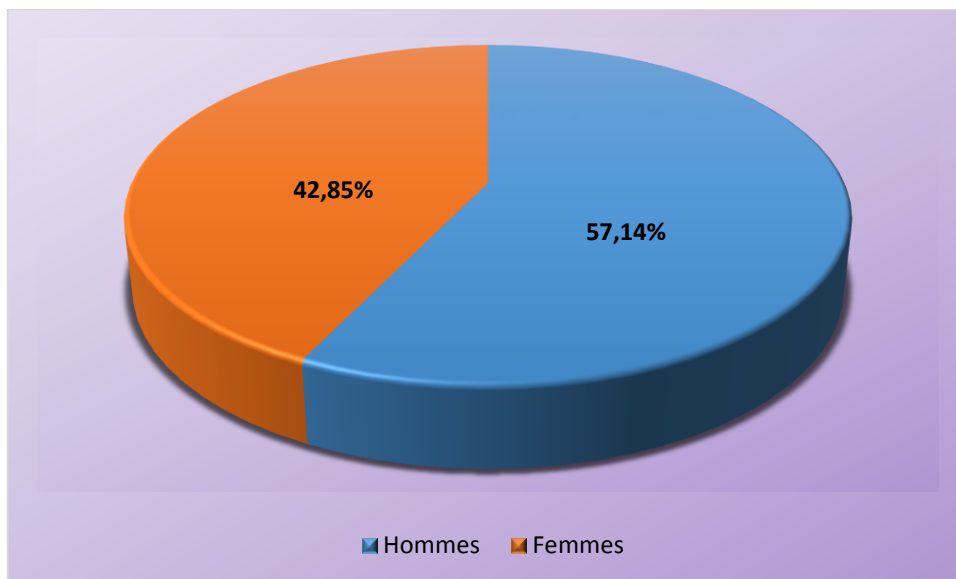


Figure 49 : Identification des patients selon leur sexe

✚ Age :

Un âge médian de 44 ans (31-62 ans, 25e, 75e). Les classes d'âge > 65 ans et 35-44 ans sont touchées à 18,37% (18/98) et à 17,35% (17/98) respectivement. Nous avons noté que l'âge de 14 (14,28%) patients est inconnu (**Figure 50**).

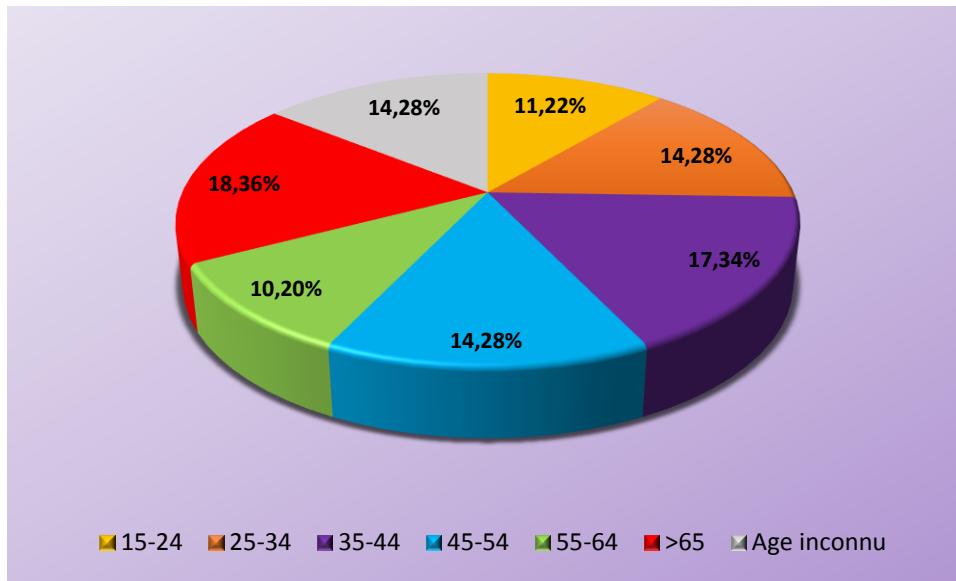


Figure 50 : Identification des patients selon les classes d'âge

Plus précisément, la proportion d'hommes était significativement plus élevée que la proportion de femmes dans la tranche d'âge 45-64 ans (66,66% vs 33,34%, $p = 0,001$), alors que la proportion entre les deux sexes était similaire dans les autres tranches d'âge. Par conséquent, le ratio homme / femme était le plus élevé (2,33) dans le groupe d'âge des 55 à 64 ans.

Les patients âgés de 65 ans et plus sont les plus touchés (18/98 ; 18,37 %), avec 10/56 (17,86 %) du sexe masculin et 8/42 (19,05 %) du sexe féminin. Chez les hommes, la fréquence élevée est observée chez les patients âgés de plus de 65 ans et ceux de 35-44 ans (10/56 ; 17,86 %), suivis de ceux âgés de 45-54 ans (9/56 ; 16,07%). Chez les femmes, la fréquence élevée est observée chez les patients du groupe d'âge 25-34 ans et ceux âgés de 65 ans et plus (8/42 ; 19,04%), suivis par ceux du groupe d'âge 35-44 (7/42 ; 16,67%). Aucun cas pédiatrique (âge <15 ans) n'a été inclus dans cette étude (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Les caractéristiques démographiques des cas de tuberculose étudiés

Sexe	Nombre d'hommes et de femmes dans les tranches d'âge (nombre et %)								Total
	0-14 (n = 0)	15-24 (n = 11)	25-34 (n = 14)	35-44 (n = 17)	45-54* (n = 14)	55-64* (n = 10)	>65 (n = 18)	Âge inconnu (n = 14)	
Homme	0	6	6	10	9	7	10	8	56
		54.54 ±	42.85 ±	58.82 ±	64.28 ±	70 ± 15.27	55.55 ±	57.14 ±	57.14 ±
		15.74	13.72	12.30	13.29		12.05	13.72	5.03
Femme	0	5	8	7	5	3	8	6	42
		45.45 ±	57.14 ±	41.17 ±	35.71 ±	30 ± 15.27	44.44 ±	42.85 ±	42.85 ±
		15.74	13.72	12.30	13.29		12.05	13.72	5.03
P		0.56	0.29	0.15	0.03	0.02	0.35	0.29	0.004

* Ces deux groupes d'âge ont été combinés en un seul (45-64 ans, P = 0,001)

VI-4.3. Type de tuberculose et localisation des lésions

Les résultats relatifs à la distribution des lésions sont rapportés dans le Tableau 15

Tableau 15 : localisation des lésions

Type de tuberculose	Nombre (n)	%
Pulmonaire	84	85,71
Extra-pulmonaire ;	14	14,28
• Pleurale	11	
• Ganglionnaire	02	
• Lésion purulente	01	
Total	98	100

La tuberculose pulmonaire a été diagnostiquée dans 84 cas (85,71%), tandis que la tuberculose extra-pulmonaire a été diagnostiquée dans 14 cas (14,28%), dont 11 cas de tuberculose pleurale, deux cas de tuberculose ganglionnaire (adénite pus et liquide ganglionnaire) et un cas de une lésion purulente.

Quelques souches, des 98 qui ont été repiquées sur milieu solide Middlebrook 7H10, ont été poussées (**Figure 51**).

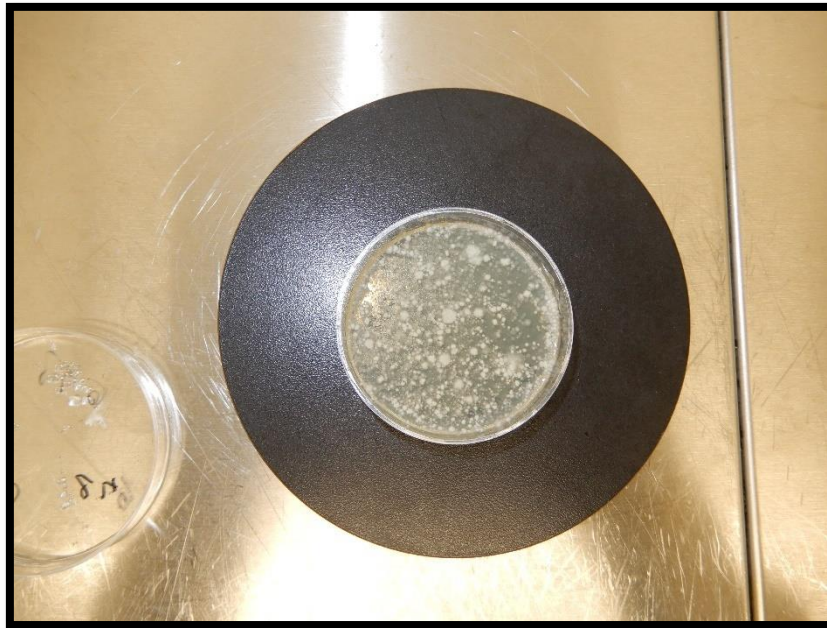


Figure 51 : Colonies de tuberculose sur Middlebrook 7H10.

VI-4.4. Génotypage du complexe *M. tuberculosis*

VI-4.4.1. PCR-sequencing of the Exact Tandem Repeat D (ETR-D)

Le système ETR-D a confirmé que les 98 isolats ont été identifiés comme le complexe *M. tuberculosis* (Figure 52 et 53).

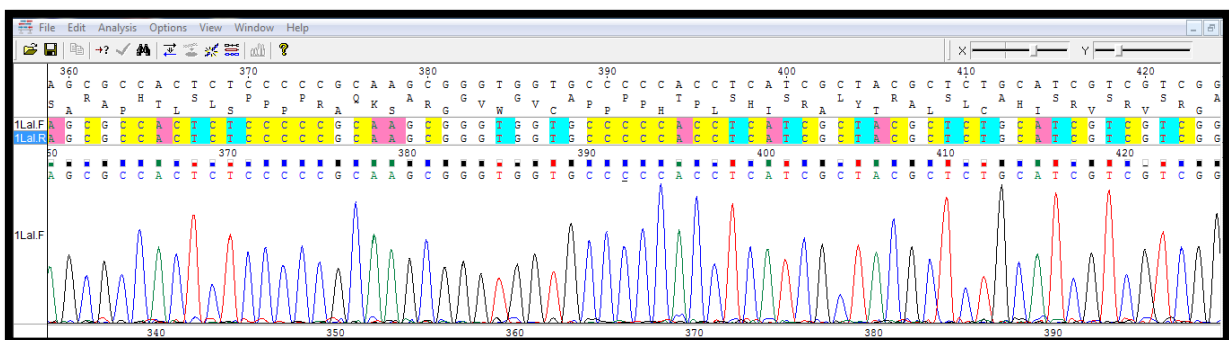


Figure 52 : Assemblage et analyse des séquences.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium tuberculosis strain M0002959-6 .complete genome	745	977	100%	0.0	100.00%	CP018304.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium tuberculosis strain I0004241-1 .complete genome	745	977	100%	0.0	100.00%	CP018303.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium tuberculosis strain I0004000-1 .complete genome	745	977	100%	0.0	100.00%	CP018302.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium tuberculosis strain I0002801-4 .complete genome	745	977	100%	0.0	100.00%	CP018301.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium tuberculosis strain PR10 .genome	745	977	100%	0.0	100.00%	CP010968.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium tuberculosis strain 96121 .complete genome	745	1032	100%	0.0	100.00%	CP009427.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium canettii CIPT 140010059 .complete genome	745	1032	100%	0.0	100.00%	HE572590.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium canettii putative histidine kinase Senx3 .gene .partial cds ; putative histidine kinase .Senx3-sensory transduction protein Regx3	745	898	100%	0.0	100.00%	EU180231.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mycobacterium africanum strain UT307 .genome	739	1032	100%	0.0	99.75%	CP014617.1

Figure 53 : Résultats du Blast (souche du complexe *M. tuberculosis*).

VI-4.4.2. PCR- Séquençage du gène de la polykétide synthase *pks15/1* et RD (RD105, RD239 and RD750)

Un total de 88 isolats (89,8%) ont été génotypés comme la lignée Euro-Américaine *M. tuberculosis sensu stricto* (lignée 4), définie par la délétion de 7 pb aux positions 152 à 158 dans le gène *pks15 / 1* (polykétide synthase) (**Figure 54**).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
226 bits(122)	3e-64	140/147(95%)	7/147(4%)	Plus/Plus
Query 2	CTGGGTTGGCCTGCACGTGGGCCATAAGTCGACCGCCCTGGCCGTCAACGCCTCAGCCG			61
Sbjct 58	CTGGGTTGGCCTGCACGTGGGCCATAAGTCGACCGCCCTGGCCGTCAACGCCTCAGCCG			117
Query 62	ATCTCGCCGAAATCACCCACGGCACCATCGACGG-----CCGCGGCCCCCGGTGCTTT			114
Sbjct 118	ATCTCGCCGAAATCACCCACGGCACCATCGACGGCCCGCGGCCCCCGGTGCTTT			177
Query 115	CGCTCGCCTCAACCGGCGCCTCTGCGG			141
Sbjct 178	CGCTCGCCTCAACCGGCGCCTCTGCGG			204

Figure 54 : Délétion de 7-bp (position 152 à 158)

Quatre et six souches ont montré une délétion de 6 pb aux positions 159 à 164 dans le gène *pks15/1* (**Figure 55**) et une absence de délétion (**Figure 56**) dans le même gène, respectivement.

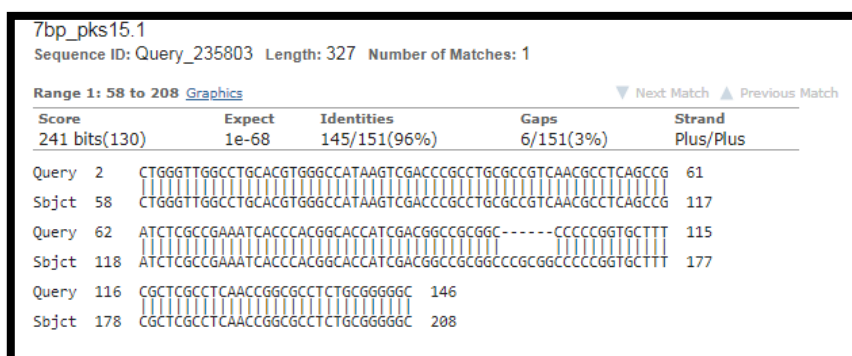


Figure 55 : Délétion de 6-bp (position 159 à 164)

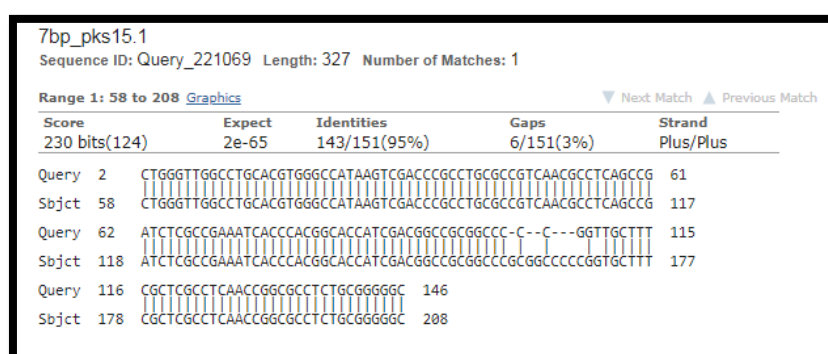


Figure 56: Absence de délétion

Ensuite, l'une de ces six souches a été génotypée comme génotype Est-Asiatique (Beijing ou lignée 2) en présentant la délétion dans RD105, alors que les cinq souches restantes ne présentaient aucune délétion RD.

VI-4.4.3. Analyse du séquençage du génome entier

Quatre isolats supplémentaires présentaient une délétion de 6 pb dans le gène pks15 / 1, tandis que cinq isolats présentaient une absence de délétion dans le gène pks15 / 1, dans RD105, RD239 et RD750. Ces neuf isolats ont été séquencés sur le génome entier: cinq isolats ont été identifiés comme *M. tuberculosis sensu stricto* de la lignée Euro-Américaine (isolats P9982, P9983, P9984, P9985 et P9986 avec les numéros d'accès GenBank correspondants ERR3588223, ERR3588225, ERR3588243, ERR3588246 et ERR3588247, respectivement) et quatre isolats ont été identifiés comme *M. bovis* (lignage BOV) (isolats P9978, P9979, P9980 et P9981 avec les numéros d'accès GenBank correspondants ERR3587501, ERR3587591, ERR3587597 et ERR3588222, respectivement) (**Figure 57**).

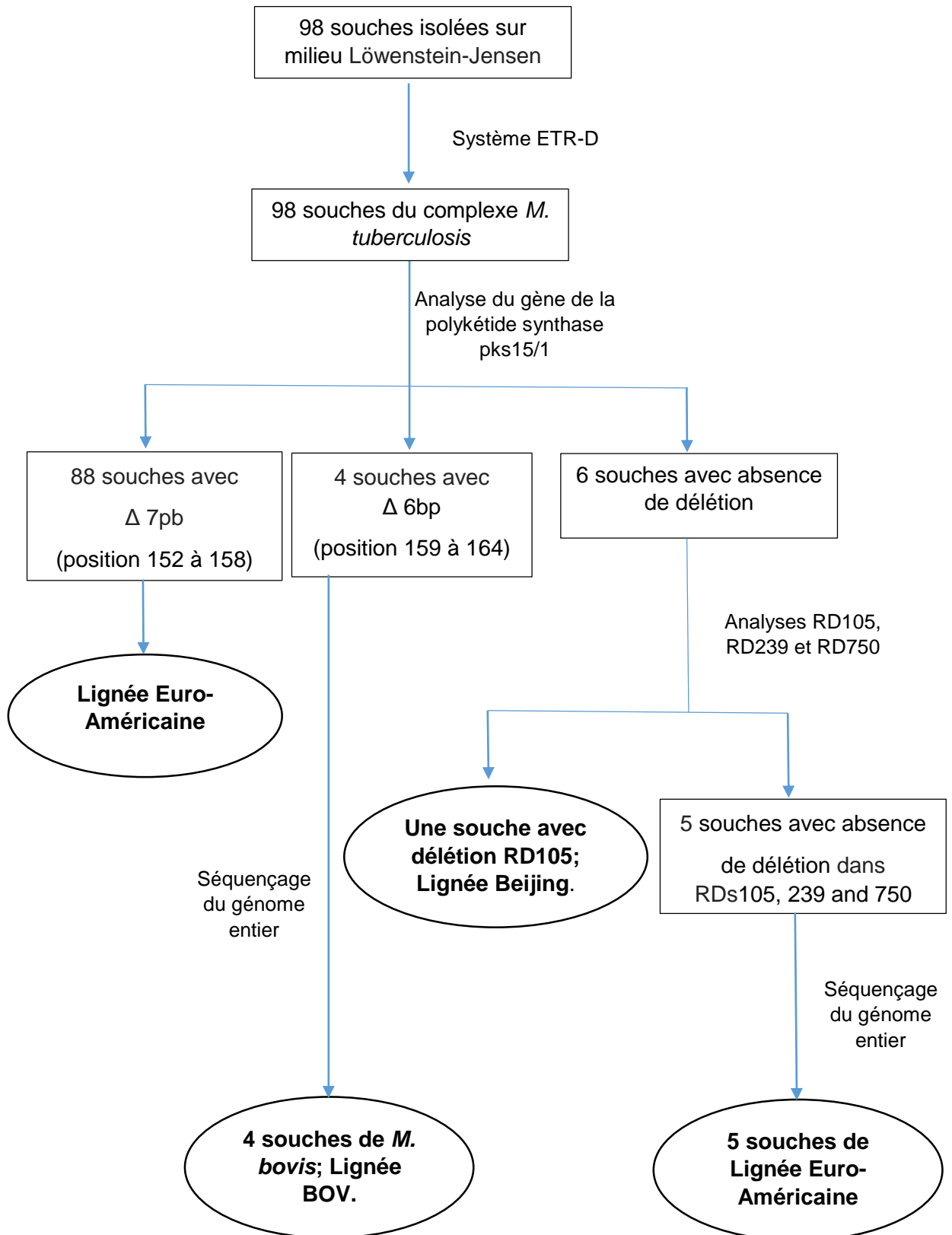


Figure 57 : Présentation schématique de la démarche suivie pour l'identification des lignées de *Mycobacterium tuberculosis* circulant en Algérie.

L'analyse pan-génomique a indiqué que *M. bovis* CSURP9981 était groupé avec *M. bovis* CSURP9979, tandis que *M. bovis* CSURP9980 était lié à *M. bovis* CSURP9978. Le génome central de 3.732.808 pb de ces quatre isolats comprenait des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) de 3 761 pb (0,1%).

En résumé, la collection de 98 isolats étudiés ici comprenait 93 (94,9%) isolats de la lignée 4 de *M. tuberculosis*, un isolat (1,02%) de la lignée 2 de *M. tuberculosis* et quatre (4,08%) isolats de *M. bovis* (lignée BOV) (**Figure 58**).

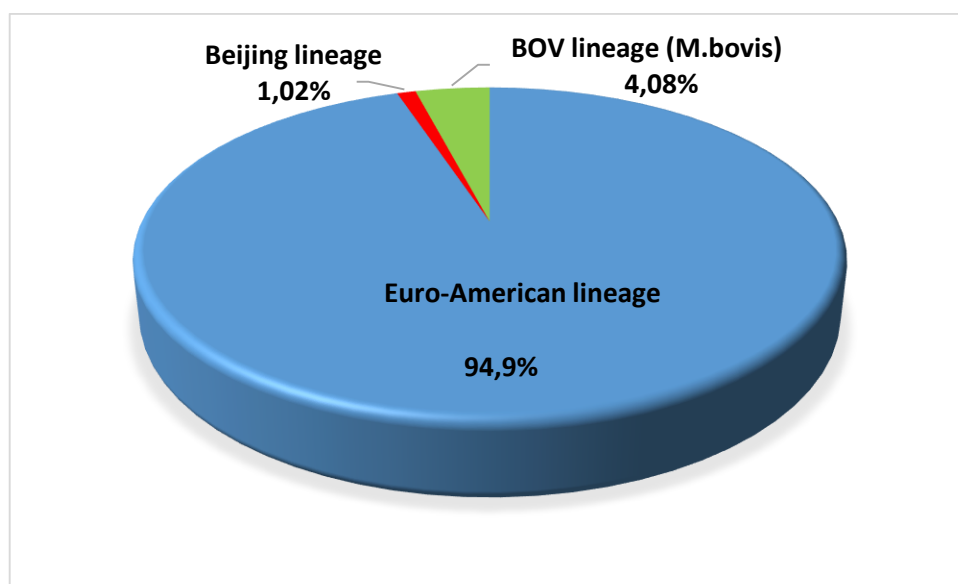


Figure 58 : Répartition des lignées du complexe *Mycobacterium tuberculosis* circulant en Algérie.

VI-4.5. Localisation des lignées

Les mycobactéries de la lignée 4 de *M. tuberculosis* ont été isolées de la tuberculose pulmonaire dans 79/93 cas (84,95%), alors que 14/93 cas (15,05%) représentaient une localisation extrapulmonaire, dont 11 cas de tuberculose pleurale, deux cas de tuberculose ganglionnaire et un cas d'une lésion purulente. La seule souche de *M. tuberculosis* Beijing a été isolée à partir d'un échantillon de liquide bronchique. Les quatre isolats de *M. bovis* ont été isolés chez quatre patients atteints de tuberculose pulmonaire.

VI-4.6. Répartition géographique des lignées

La lignée *M. tuberculosis* 4 était la lignée prédominante dans les cinq départements et la seule récupérée dans les départements de Bgayet, Tizi-Ouzou et Médéa. La différence de répartition de cette lignée entre les départements n'était pas significative ($p = 0,66$). Une seule lignée 2 de *M. tuberculosis* a été isolée dans le département de Blida. Quatre isolats de *M. bovis* ont été collectés dans le département de Blida (2/40 isolats ; 5%) et dans le département d'Ain Defla (2/16 isolats ; 12,5%) (**Tableau 16**). Par conséquent, dans ces deux dernières régions la fréquence de *M. bovis* est estimée à 7,14% (4/56isolats) (**Figure 59**).

Tableau 16 : Distribution de différentes lignées dans cinq départements d'Algérie.

Département	Nombre de souches	Nombre de différentes lignées (%)				
		lignée 1	lignée 2	lignée 3	lignée 4	lignée BOV
Bgayet	20	0	0	0	20 (100)	0
Tizi-Ouzou	06	0	0	0	06 (100)	0
Blida	40	0	1 (2.5)	0	37 (92.5)	2 (5)
Médéa	16	0	0	0	16 (100)	0
Ain Defla	16	0	0	0	14 (87.5)	2 (12.5)
Total	98	0	1 (1.02)	0	93 (94.9)	4 (4.08)

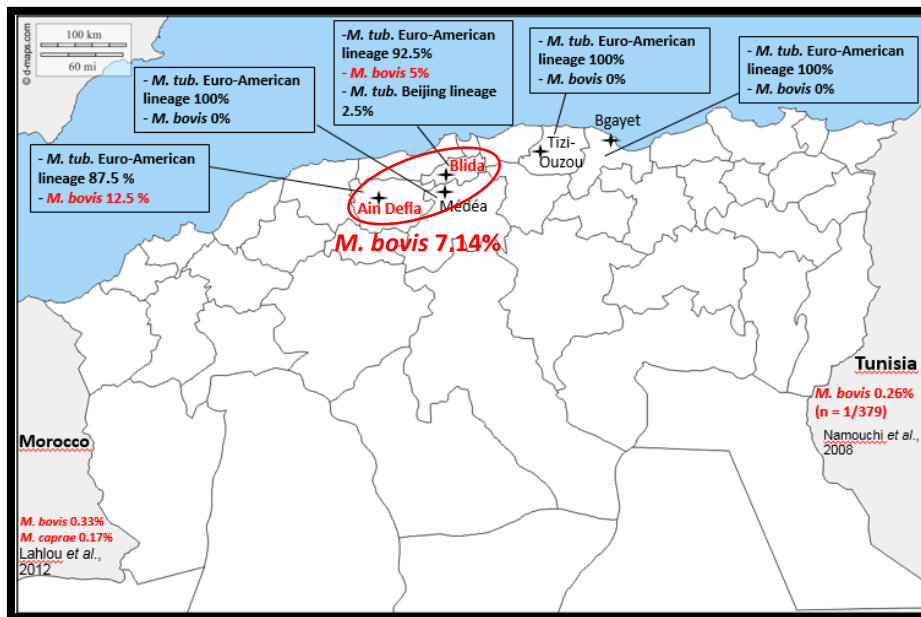


Figure 59 : Fréquence des cas à *M. bovis* dans les deux départements.

Une comparaison plus poussée des isolats bovins (deuxième enquête) avec quatre isolats de *M. bovis* de patients Algériens disponibles ici comme appartenant au groupe européen 2 (P9978, P9979, P9980 et P9981) (troisième enquête) n'a indiqué aucune preuve d'infection zoonotique de ces isolats seuls en utilisant le même SNP coupure comme ci-dessus (12-SNP). Les lectures ont été déposées dans GenBank avec le numéro d'accèsion PRJNA715078.

VI-5. DISCUSSION

La tuberculose reste un problème de santé publique en Algérie (M.S.P.R.H, 2011 ; Nacef et *al.*, 2015) et cela malgré le programme de lutte mis en place depuis l'indépendance (Nacef et *al.*, 2015), la prise en charge du dépistage, diagnostic et le traitement est assurée par l'état. Le diagnostic microbiologique repose souvent sur la bacilloscopie dans la plus part des laboratoires et la culture de l'agent causal ne se fait pas. A titre d'exemple dans la région de Bgayet, un seul des huit services de lutte contre la tuberculose et les maladies respiratoires (S.C.T.M.R.) répartis dans huit communes, est doté de culture.

Son incidence en 2017 était estimée entre 53 et 88 cas pour 100 000 habitants (Bouziane et *al.*, 2019). Cependant, ces chiffres ne sont que des estimations car en Algérie, le diagnostic de tuberculose est basé souvent sur l'examen microscopique, qui manque de sensibilité et de spécificité. Par conséquent, on en sait peu de choses sur l'espèce à l'origine du complexe *M. tuberculosis* responsable des différentes formes cliniques signalées dans le pays.

Au cours de la période d'étude, nous avons pu récupérer, auprès de cinq S.C.T.M.R., 98 isolats préalablement cultivés sur milieu Löwenstein-Jensen et prélevés sur 98 patients.

Facteur de variations

Dans cette étude, nous avons rapporté que les hommes ($n = 56$; $57,14 \pm 5,03$ %) étaient significativement plus touchés que les femmes ($n = 42$; $42,85 \pm 5,03$ %) ($p = 0,004$) et la localisation pulmonaire de la tuberculose représentée par 84 cas (85,71%) alors que 14 cas (14,28%) souffraient d'une tuberculose extrapulmonaire. Ainsi, dans une étude menée dans 14 départements d'Algérie, Ifticene et *al.* (2015) ont rapporté des résultats similaires avec 76 (58%) hommes et 53 (42%) femmes, ces mêmes auteurs ont également rapporté que 114 (88%) souches ont été isolées à partir d'une localisation pulmonaire et que 15 (12%) des cas représentent une localisation extrapulmonaire.

Génotypage du complexe *M. tuberculosis*

Dans cette étude, l'Exact Tandem Repeat D (ETR-D) a confirmé que toutes les souches isolées sur Löwenstein-Jensen sont des souches tuberculeuses appartenant au complexe *M. tuberculosis*, ce qui témoigne d'une excellente sensibilité de la culture. Ainsi, Brunello (1999) a rapporté la haute sensibilité de ce milieu avec 98,2% et 91,5% pour détecter respectivement le complexe *M. tuberculosis* et les mycobactéries non tuberculeuses. Cependant, Sorlozano et

al. (2009) ont obtenu une sensibilité de 80 % et 76,2 % pour détecter respectivement le complexe *M. tuberculosis* et les mycobactéries non tuberculeuses. Cependant, Rishi et *al.* (2007) ont décrit une faible sensibilité de ce milieu avec 63,95% pour toutes les mycobactéries. Le génome de *M. tuberculosis* est connu par son hétérogénéité (Gagneux et *al.*, 2006). Le polymorphisme à grande séquence (LPS) basé sur la région de différence génomique (RD) classe ce pathogène en six lignées mondiales majeures, chaque lignée étant étroitement liée à une région géographique spécifique (Krishnan et *al.*, 2011; Omae et *al.*, 2017).

Nous rapportons, dans cette étude, l'identification et le typage basés sur la séquence d'ADN d'une collection d'isolats du complexe *M. tuberculosis* à partir d'échantillons cliniques humains sur quatre ans dans cinq départements en Algérie. Bien que les données rapportées ici n'aient pas été obtenues de l'ensemble du pays, elles provenaient de cinq départements couvrant environ sept millions d'habitants, soit 16,3% de la population totale qui était de 43 millions d'Algériens au 1^{er} janvier 2019 (Berrah, 2019), donnant ainsi un aperçu contributif de la situation actuelle de la tuberculose humaine en Algérie.

Le typage des lignées de *M. tuberculosis* est une étape importante de l'épidémiologie moléculaire de la tuberculose. Dans cette étude, nous avons utilisé le génotype LPS et WGS et sur les 98 souches du complexe *M. tuberculosis* précédemment identifiées, 93 (94,9%) appartenaient à la lignée 4 *M. tuberculosis*, 4 (4,08%) étaient de la lignée Bov (*M. bovis*) et une (1,02%) lignée 2 (Pékin).

Les résultats ont montré que la lignée 4 de *M. tuberculosis* est la lignée prédominante ; cette lignée est la plus répandue en Europe et dans les Amériques, mais aussi dans différentes régions d'Afrique notamment en Afrique du Nord (Gagneux et *al.*, 2006).

En outre, les données ont confirmé les résultats d'une précédente étude menée dans 14 départements du pays, qui, sur la base du spoligotypage, a révélé que la plupart des isolats étudiés appartenaient à la lignée 4 de *M. tuberculosis*, celle que nous avons trouvée prédominante dans notre étude. Le spoligotypage a permis d'affiner le génotypage pour indiquer que les isolats de la lignée 4 se répartissaient entre le clade Haarlem, le clade latino-américain et méditerranéen et le clade T, représentant respectivement 29,5%, 25,6% et 24,8% des isolats étudiés (Ifticene et *al.*, 2015).

En effet, nos observations sont en accord avec les observations faites dans les pays voisins, la lignée 4 étant répandue dans les régions d'Afrique du Nord (Gagneux et *al.*, 2006). Au Maroc, un résultat similaire a été obtenu lors de l'analyse de 592 isolats qui a donné 43,7% (n =

259/592) d'isolats de LAM, 22,6% (n = 134/592) d'isolats de Haarlem et 20,1% d'isolats T (Lahlou et *al.*, 2012). En Tunisie, l'analyse de 378 souches collectées en 2001-2005 a donné 110 (29,1%) isolats de Haarlem-3 (ST50 selon SpolDB4), 65 (17,2%) isolats de LAM-9 (génotype ST42) et 40 (10,5%) T1 isolats (génotype ST53) (Namouchi et *al.*, 2008). Plus à l'Est en Libye, Lahlou (2012) et Namouchi (2008) ont rapporté que 65,4% des échantillons analysés appartenaient à ces trois clades précédemment mentionnés (Clade LAM, H et T) (Lahlou et *al.*, 2012, Namouchi et *al.*, 2008).

Au cours de notre étude, nous avons également isolé une seule souche appartenant à la lignée Beijing à Blida (n = 1/98: 1,02%). Ce génotype, également appelé génotype Est-Asiatique, est considéré par de nombreux auteurs comme une lignée au caractère virulent particulier compte tenu de son hypermutabilité qui le rend résistant aux médicaments (Ford et *al.*, 2013; Merker et *al.*, 2015), sa transmissibilité accrue (Bifani et *al.*, 2002), son hypervirulence liée à leur capacité à échapper ou à résister au système immunitaire de l'hôte (Parwati et *al.*, 2010). Ce génotype est prédominant dans les pays d'Asie de l'Est (Lahlou et *al.*, 2012), mais aussi cette lignée est distribuée dans le monde entier (Merker et *al.*, 2015).

Cette lignée est déjà isolée en Algérie, où 15 souches (14 patients algériens et 1 chinois travaillant en Algérie) ont été identifiées comme génotype Beijing par spoligotypage parmi 390 souches (3,84%), comprenait une majorité d'isolats (n= 6/15 ; 40%) de Beijing provenant de Blida (Ifticene et *al.*, 2012). Ainsi, la zone de Blida a pu être au centre des tensions de Beijing et cela pourrait être expliqué par l'immigration de travailleurs Chinois, notamment dans le secteur de la construction, à Blida (près de la capitale Alger). Cette lignée était également isolée dans d'autres pays d'Afrique du Nord voisins, comme le Maroc (n = 5/592 ; 0,84%) et la Tunisie (n = 38/298; 12,75%) (Lahlou et *al.*, 2012, A Ben Hadj Hassine et *al.*, données non publiées).

Notre approche combinant les polymorphismes de grandes séquences et le séquençage du génome entier a détecté la présence de *M. bovis* (lignée BOV) (n = 4/98, 4,08%). Ces quatre souches ont été collectées dans le département de Blida (2 isolats) et dans le département d'Ain Defla (2 isolats). Un cas à Blida était un chômeur de 27 ans qui n'a déclaré aucun contact avec du bétail, un autre cas à Blida était un chauffeur de taxi de 60 ans qui a déclaré n'avoir aucun contact direct avec le bétail mais dont le voisin était un boucher avec qui il passait beaucoup de temps. Ces deux patients ont déclaré ne pas consommer de lait cru. Deux cas à

Ain Defla concernaient des femmes au foyer de 18 ans et 43 ans vivant dans deux zones rurales différentes. Les entretiens de ces patients n'ont pas révélé de contacts avec des bovins.

Cette observation était inattendue, car à part deux cas rapportés en 2009 lors d'une étude où les moyens de la détection de *M. bovis* n'étaient pas mentionnés (Gharnaout et al., 2009) et une étude menée en 1969 enquêtant sur la fréquence de *M. bovis* dans la tuberculose humaine à Alger, les résultats ont montré que sur 1.183 souches de mycobactéries isolées, cinq souches (0,4%) de *M. bovis* ont été identifiées (trois cas de tuberculose pulmonaire et deux cas de tuberculose lymphatique cervicale) (Beco et al., 1970).

Cependant, les résultats de cette enquête étaient basés sur des tests phénotypiques (délai d'apparition et pigmentation des colonies), des tests de sensibilité notamment à l'isoniazide, TCH et des tests biochimiques. Ces méthodes conventionnelles utilisées à l'époque ne permettent pas de confirmer ou d'infirmier la présence de *M. bovis* ou son identification précise. Une récente étude réalisée à Bgayet et à Sétif, sur la base de spoligotypage, a montré existence de *M. bovis* chez l'homme (7/115) (Damene et al., 2021). Par conséquent, nos travaux et la caractérisation moléculaire que nous avons effectuée, notamment basée sur le séquençage du génome complet, peuvent être une première identification et analyse de la séquence du génome entier de *M. bovis* en Algérie avec 4,08% des isolats du complexe *M. tuberculosis*.

La tuberculose chez l'homme due à *M. bovis* ne peut être distinguée cliniquement, pathologiquement et radiologiquement de la tuberculose à *M. tuberculosis* (Wedlock et al., 2002; De la Rua-Domenech, 2006a).

Ces souches ont été collectées dans deux départements algériens (Blida et Ain Defla) abritant des troupeaux bovins. L'Algérie est connue comme un pays enzootique de tuberculose bovine (Sahraoui et al., 2009). Il serait intéressant de comparer les séquences génomiques des quatre patients rapportés ici avec celles d'isolats bovins en Algérie (ceux de la deuxième enquête) pour soutenir ou rejeter l'hypothèse d'une tuberculose zoonotique à *M. bovis* en Algérie.

Cette découverte suggère le caractère zoonotique de *M. bovis* et la possibilité de transmission de la tuberculose entre l'homme et l'animal. Cette transmission peut être due à l'ingestion de lait cru infecté (Ngandolo et al., 2009) ou à la suite d'un contact étroit avec une vache atteinte pulmonaire tuberculose (en aérosol) (Michel et al., 2010), voire une transmission interhumaine comme le démontre Sunder (2009) qui rapporte qu'une souche de *M. bovis* a été isolée chez un patient de 50 ans atteint de tuberculose pulmonaire, ce patient travaillait

depuis 1987 à l'abattoir où il manipulait des abats. Puis, en 2007, sa fille de 20 ans a la tuberculose pulmonaire de *M. bovis*. Cette transmission de *M. bovis* de père en fille a été confirmée par spoligotypage.

Cependant, *M. bovis* a également été isolé chez des patients tuberculeux dans d'autres pays méditerranéens, comme le Maroc (n = 2 souches de *M. bovis* et 1 souche de *M. caprae*; 0,33% et 0,17%, respectivement), la Tunisie (n = 1 souche, 0,26%), France (n = 13 souches de *M. bovis* et 2 de *M. caprae*; 2,5% et 0,38% respectivement), Espagne (n = 89 souches de *M. bovis* et 21 de *M. caprae*; 1,9% et 0,3% respectivement), Italie (n = 9 souches; 1,76%) (Lahlou et al., 2012, Namouchi et al., 2008, Aimé et al., 2012, Rodríguez et al., 2009 et Lombardi et al., 2017).

L'OMS a rapporté en 1998 que *M. bovis* était responsable de 3,1% de la tuberculose humaine dans le monde et que cette prévalence se situerait entre 0,4 et 10% des isolats d'expectoration des patients en Afrique (Michel et al., 2010).

Les quatre isolats de *M. bovis* ont été récupérés chez quatre patients atteints de tuberculose pulmonaire. Cependant, plusieurs auteurs rapportent que *M. bovis* est souvent isolé en localisation extrapulmonaire, Lombardi (2017) rapporte que 7/9 souches (77,8%) de *M. bovis* isolées chez l'homme, le sont en localisation extrapulmonaire. De plus, Torres-Gonzalez et al. (2016) rapportent que la localisation extra-pulmonaire de la tuberculose humaine est liée à la présence de *M. bovis*.

Cette localisation pulmonaire pourrait s'expliquer par le mode le plus courant de transmission de la tuberculose (transmission aérienne) qui peut survenir chez les vétérinaires, les éleveurs et les abattoirs lors de la manipulation des abats en particulier dans zones où les bovins sont infectés (Thoen et al., 2006; Sunder et al., 2009; Michel et al., 2010). Nous avons également constaté une absence totale de *M. bovis* en localisation extrapulmonaire, en particulier dans l'atteinte digestive, qui pourrait être liée l'apparition de la pratique de l'ébullition du lait et l'introduction de la pasteurisation du lait dans les usines (Thoen et al., 2006).

CONCLUSION

La caractérisation des lignées circulantes de *M. tuberculosis* a été réalisée pour la première fois en Algérie par typage de polymorphisme à grande séquence (LPS) et analyse du séquençage du génome entier (WGS). Nous avons enquêté sur cinq départements, à savoir, le département du Bgayet (n = 20 isolats), le département de Tizi-Ouzou (n = 06), le département de Médéa (n = 16), le département de l'Ain Defla (n = 16) et le département de Blida (n = 40). Les résultats obtenus ont montré que la population de *M. tuberculosis* circulant en Algérie se caractérise par une prédominance de la lignée Euro-Américaine dans les cinq départements mentionnés précédemment. Quatre souches de *M. bovis* ont été isolées dans deux départements (Blida et Ain Defla), et une seule souche, Beijing, a été isolée à Blida. Nous rapportons les preuves de l'existence de *M. bovis* comme cause de tuberculose humaine en Algérie ; le pourcentage (4,08%) n'est pas négligeable. Habituellement, l'exposition à *M. bovis* transmise par les aérosols des bovins reste la plus élevée chez les travailleurs des abattoirs, les vétérinaires et les éleveurs (Michel et *al.*, 2010). Dans ce cas, la lutte contre la tuberculose chez l'homme repose en partie sur l'éradication de la tuberculose chez les bovins, et le concept «One Health» invite au renforcement de la collaboration intersectorielle pour lutter contre la tuberculose bovine et humaine (FAO, 2012). Notre étude a montré que quatre patients n'étaient pas en contact direct avec le bétail, illustrant qu'en Algérie, la tuberculose à *M. bovis* n'est pas seulement une maladie professionnelle et que des sources de contamination domestiques existent.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

En matière de la prophylaxie et de la lutte, à laquelle il faut donner beaucoup d'importance, nous incitons à :

- ✓ Etablir un diagnostic précoce de la tuberculose chez l'homme et prise en charge adéquate pour les tuberculeux afin d'assurer leur guérison et minimiser la transmission du bacille aux autres personnes.
- ✓ Sensibiliser les populations sur le danger de la consommation du lait cru et exiger sa pasteurisation.
- ✓ Informer le personnel de l'abattoir du danger de la tuberculose zoonotique et des précautions à prendre devant un cas de tuberculose animale rencontré.
- ✓ Equiper les laboratoires par des moyens nécessaires pour la mise en culture des échantillons.
- ✓ Renforcer les moyens d'identifications dans les laboratoires, comme l'identification biochimiques et/ou moléculaires.
- ✓ La recherche et la confirmation de l'espèce mycobactérienne en cause afin d'instaurer un traitement antibiotique approprié, en tenant compte de la résistance naturelle de *M. bovis* au pyrazinamide antimycobactérien de première intention.

CONCLUSION GENERALE

L'inspection *post-mortem* des viandes à l'abattoir est un moyen de contrôle de routine de plusieurs maladies zoonotiques notamment la tuberculose. Cette dernière est une zoonose majeure responsable de sérieux problèmes économiques et de santé publique.

La caractérisation des souches de *M.bovis* celles de *M. tuberculosis* par analyse du séquençage du génome entier (WGS) a été réalisée pour la première fois en Algérie.

Au terme de ces travaux nous avons rapporté la preuve de l'existence de la tuberculose bovine dans nos abattoirs et les pertes directes observées lors des saisies de viande, nous avons rapporté aussi la prédominance de la forme respiratoire qui peut être une source potentielle de la tuberculose zoonotique.

Nous avons aussi identifié sur le plan moléculaire, notamment basée sur le séquençage du génome complet, les espèces mycobactériennes impliquées.

La tuberculose bovine chez les bovins, en Algérie, est en partie déterminée par les mouvements transfrontaliers d'animaux et de produits animaux.

Nous rapportons les preuves de l'existence de *M. bovis* comme cause de tuberculose humaine en Algérie. Notre étude a montré que ces patients n'étaient pas en contact direct avec le bétail, illustrant qu'en Algérie, la tuberculose à *M. bovis* n'est pas seulement une maladie professionnelle et que des sources de contamination domestiques existent.

Enfin, à l'aide du séquençage du génome complet (WGS), cette étude a fourni, pour la première fois, une meilleure compréhension de la situation de la tuberculose bovine et humaine dans différents départements du territoire Algérien.

Fiche de renseignements (prélèvement)

La date :

Numéro du pot :

Abattoir de :

Identification de l'élevage d'origine :

Nom de l'éleveur (facultatif) :

Adresse (facultative) :

Commune :

Identification de l'animal :

N° de matricule (facultatif) :

Race :

Sexe :

Age :

Etat d'embonpoint : Maigre Moyen Gras

Abattage :

Boucherie :

Sanitaire :

Type de lésions :

1/Organes : Poumon Foie : Tube digestif : Mamelle :

Utérus : Rein : Plèvre : Autres (préciser) :

2/ Ganglionnaire (préciser) :

3/Stade de lésions :

Lésions miliaires :

Lésions caséo-calcaires :

Autres :

Fiche de renseignements (systématique*)

* : Cette fiche concerne tous les bovins abattus dans cet abattoir même en absence de toute lésion suspecte de tuberculose bovine

La date :

Abattoir de :

Animaux	Variable	Animaux examinés
Sexe	Mâle	
	Femelle	
	Total	
Age	< 2 ans	
	2-5 Ans	
	>5 ans	
	Total	
Etat	Maigre	
	Moyen	
	Gras	
	Total	
Race		
	Locale	
	Total	
Commune		
	Total	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

« A »

Abdellrazeq G.S., M.M. El-Naggar, H.S. Osman, W.C. Davis, M. Singh. (2014). Prevalence of bovine tuberculosis in Egyptian cattle and the standardization of the interferon-gamma assay as an ancillary test, *Transbound. Emerg. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12291>, Nov.

Acha P.N., Szyfres B. (1989). Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, 2e éd. Paris, France, OIE, 1083 p.

Adékambi T., Colson P., Drancourt M. (2003). rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 41(12): 5699-5708. DOI: 10.1128/JCM.41.12.5699-5708.2003

Ahmad, Ibrahim, Kudi, Caleb Ayuba, Abdulkadir, Alhaji Idris, *et al.* (2017). Occurrence and distribution of bovine TB pathology by age, sex, and breed of cattle slaughtered in Gusau Abattoir, Zamfara State Nigeria. *Tropical animal health and production*, vol. 49, no 3, p. 583-589.

Ahogni Gustave (2017). Coloration de Ziehl Neelsen à chaud et coloration à l'auramine pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Rapport de fin de stage pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. <https://biblionumeric.epac-uac.org:9443/jspui/handle/123456789/805>

Aimé, B., Lequen, L., Balageas, A., *et al* (2012). Infections à *M. bovis* et *M. caprae* en Aquitaine: étude clinico-épidémiologique de 15 cas. *Pathologie Biologie*, , vol. 60, no 3, p. 156-159.

Aimé, B., Lequen, L., Balageas, A., *et al.* (2012). Infections à *M. bovis* et *M. caprae* en Aquitaine: étude clinico-épidémiologique de 15 cas. *Pathologie Biologie*, vol. 60, no 3, p. 156-159.

Alihalassa sofiane. M.S.P.R.H. Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. Programme National de Lutte Contre la Tuberculose. La Tuberculose en l'an 2016. Journée mondiale de la tuberculose. Institut Pasteur d'Algérie, 26 Mars 2017.

Aliyu M.M., Adamu J.Y., Bilyaminu Y.A. (2009). Current Prevalence of Tuberculous Lesions among Slaughtered Cattle in Northeastern States of Nigeria. *Revue Élev.Méd. vét. Pays trop.* 62, 13-16.

Aljada, I. S., Crane, J. K., Corriere, N., Wagle, D. G., & Amsterdam, D. (1999). *Mycobacterium bovis* BCG causing vertebral osteomyelitis (Pott's disease) following intravesical BCG therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 2106-2108.

Aljameel, M. A., Abdel Wahab, M. B., Fayza, A. O., El Tigani, A. E. and Abdellatif, M. M. (2014). Occurrence of bovine tuberculosis at Nyala abattoirs in South Darfur State, Sudan. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 67(2): 61-65.

Amanfu W. (2006). The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis*. 86 (3-4): 330-335.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.01.007>.

Ameni, G., Tadesse, K., Hailu, E., Deresse, Y., Medhin, G., Aseffa, A., ... & Berg, S. (2013). Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* between farmers and cattle in central Ethiopia. *PLoS One*, 8(10), e76891.

Andréjak, C., Lescure, F. X., Schmit, J. L., & Jounieaux, V. (2011). Diagnostic et traitement des mycobactérioses atypiques d'expression respiratoire. *Revue des maladies Respiratoires*, 28(10), 1293-1309.

Angelakis E., Roux V., Raoult D, Rolain J.M. (2009). Real-time PCR strategy and detection of bacterial agents of lymphadenitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28:1363–1368.
<https://doi.org/10.1007/s10096-009-0793-6>.

ANSES. (2016). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. La tuberculose bovine. <https://www.anses.fr/fr/content/la-tuberculose-bovine>

Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., & Domínguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 1785-1789.

Aranaz, A., E. Liebana, E. Gomez-Mampaso, J. C. Galan, D. Cousins, A. Ortega, J. Blazquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suarez, et L. Dominguez. (1999). *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*: a taxonomic study of a newmember of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 49:1263-1273.

Araújo, C. P. D., Leite, C. Q. F., Prince, K. A. D., Jorge, K. D. S. G., & Osório, A. L. A. R. (2005). *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 749-752.

Asmar, Shady et Drancourt, Michel. (2015). Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC microbiology*. 15 (1):155. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0479-4>.

Asseged, B., Z. Woldesenbet, E. Yimer, and E. Lemma (2004). Evaluation of abattoir inspection for the diagnosis of *M. bovis* infection in cattle in Addis Ababa abattoir. *Trop. Anim. Health Prod.* 36, 537–546.

Avril J.L ., Dabernat H., Denis F., Mentel H. (2003). *Bacteriologie clinique édition ellipses*.534p

Awah Ndukum J., Caleb Kudi A. G., Ane-Anyan gwe I. N., Fon-Tebug S., Tchoumboue J. (2010). Prevalence of Bovine Tuberculosis in Abattoirs of the Littoral and Western Highland Regions of Cameroon: A Cause for Public Health Concern. *VeterinaryMedicine International*, Article ID 495015, 8 pages, doi:10.4061/2010/495015.

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. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(8), 924-937.

« B »

Babady N. Esther and Wengenack Nancy L. (2012). *Clinical Laboratory Diagnostics for Mycobacterium tuberculosis*, Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), ISBN: 978-953-307-938-7. 552 pages, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding->

tuberculosis-global-experiences-and-innovative-approaches-to-the-diagnosis/clinical-laboratory-diagnostics-for-mycobacterium-tuberculosis.

Bandeira, I. P., da Silva, C. F., Martin, M. E. M., da Silva, G. F., Parolin, L. F., Melo, L. H., & Gonçalves, M. V. M. (2020). Latent Tuberculosis Infection in Patients with Multiple Sclerosis.

Barasona, J.A., Vicente, J., Díez-Delgado, I., Aznar, J., Gortázar, C., Torres, M.J. (2016). Environmental presence of *Mycobacterium tuberculosis complex* in aggregation points at the wildlife/livestock interface. *Transbound. Emerg. Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12480>.

Barnard, M., Albert, H., Coetzee, G., O'Brien, R., & Bosman, M. E. (2008). Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(7), 787-792.

Barry Iii, C. E., Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., & Yuan, Y. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in lipid research*, 37(2-3), 143-179.

Beco O, Boulahbal F, Grosset J. (1970). The frequency of bovine bacillus in human tuberculosis in Algiers in 1969. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*. 48: 93-101.

Belkhiri M, Tlidge M, Benhathat Y. Meziane T. (2009). Histopathological study and pulmonary classification of bovine lesions. *Afr. J. Agric. Res.* 4(7): 584-591.

Ben Hadj Hassine A. et al., Les données non publiées.

Bendadda Ouafae. (2003). Tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis* : Enquête bactériologique et application de la PCR à la détection et l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse de Doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. Maroc.

Bénet JJ. (2009). La tuberculose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Merial.

Bénet JJ., Praud A. et al. (2014). La tuberculose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Merial (Lyon), 100 p.

Bénet JJ., Praud A. *et al.* (2016). La tuberculose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Mériat (Lyon), 100 p.

Berrah Mounir Khaled (2019). Démographie Algérienne 2018 N°853. Direction Technique chargée des statistiques de Population et de l'Emploi. Office National des Statistiques. Consulté le 20/01/2022 à partir <https://www.ons.dz/IMG/pdf/Demographie2018.pdf>

Best, M., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., & Kennedy, M. E. (1990). Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(10), 2234-2239.

Biet F., Boschioli M.L., Thorel M.F., Guilloteau L.A., 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *In: Vet. Res.*, Vol.36, p. 411-436.

Bifani, Pablo J., Mathema, Barun, Kurepina, Natalia E., *et al.* (2002). Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends in microbiology*, vol. 10, no 1, p. 45-52.

Boireau Clémence, Marie, Lucie. (2015). Etude des caractéristiques intrinsèques du test interféron gamma utilisé en série suite à une intradermotuberculination dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine en France et enquête sociologique auprès des acteurs locaux. Thèse. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

Boland F, Kelly G. E, Good M, More S. J. (2010). Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 93 (2-3): 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.09.021>.

Bouguedour, R., & Ripani, A. (2016). Review of the foot and mouth disease situation in North Africa and the risk of introducing the disease into Europe. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 35(3), 757-768.

Boukary, A. R., Chaibou, M., Marichatou, H., & Vias, G. F. (2007). Caractérisation des systèmes de production laitière et analyse des stratégies de valorisation du lait en milieu rural et périurbain au Niger : cas de la communauté urbaine de Niamey et de la commune rurale de Filingué. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 60 (1-4), 113-120.

Boukary, A. R., Thys, E., Rigouts, L., Matthys, F., Berkvens, D., Mahamadou, I., ... & Saegerman, C. (2012). Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in Niger. *Transboundary and emerging diseases*, 59(6), 490-502.

Boukary, A.R., E. Thys, S. Mamadou, L. Rigouts, F. Matthys, S.G. Vias Franck, D. Gamatie, A.Yenikoye and C. Saegerman. (2011). La tuberculose à *Mycobacterium bovis* en Afrique subsaharienne. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 155: 23-37.

Bourgoin, A., & Agius, G. (1995). *Le point sur les méthodes classiques d'identification des mycobactéries*. *Revue Française Des Laboratoires*, 1995(273), 21–26. doi:10.1016/s0338-9898(95)80194-4

Bouziane F, Allem, R Sebahia M, Kumanski S, Mougari F, Sougakoff W, et al. First genetic characterization of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* In press 2019.

Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1-3), 91-97.

Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 29-63.

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., ... & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 99(6), 3684-3689.

Brown-Elliott BA, Wallace RJ. *Mycobacterium*: clinical and laboratory characteristics of rapidly growing mycobacteria. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 1. 10th ed.. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 525_38.

Brown-Elliott BA. Rapidly growing mycobacteria. In: Schlossberg D, editor. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. 6th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011.

Brown-Elliott, B. A., & Wallace Jr, R. J. (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 716-746.

Brunello, F., F. Favari, and R. Fontana. (1999). Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1206-1209.

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. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), 14-22.

« C »

Calmette A, Guérin C, Nègre L, Boquet A. (1926). Prémunition des nouveaux-nés contre la tuberculose par le vaccin BCG, 1921–1926. *Ann Inst Pasteur (Paris)*; 40:89–133.

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. *Journal of comparative pathology*, 121(4), 321-337.

Castets, M., Boisvert, H., Grumbach, F., Brunel, M., & Rist, N. (1968). Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. *Revue de tuberculose et de pneumologie*, 32(2), 179-184.

Cattoir V., 2004. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. *In :Ann. Biol. Clin.*, vol.62, n°4 , p.405-413.

Chambers M. A, Williams A., Gavier-Widén D., 337 Whelan A., Hall G., Marsh P. D, et al. (2000). Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG Auxotrophic Mutant That Protects Guinea Pigs against *M. bovis* and Hematogenous Spread of *Mycobacterium tuberculosis* without Sensitization to Tuberculin. *Infect. Immun.* 68 (12):7094-7099. DOI: 10.1128/IAI.68.12.7094-7099.2000.

Chantal, J., Dorchies, P. and Legueno, B. (1994). A Study on Some Zoonoses in Djibouti Republic. I. Ruminants from Djibouti Slaughterhouse. *Rev Med Vet (Toulouse)* 8-9:633-640.

Chartier, C. (1991). Un nouveau cas de tuberculose. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop*, 44(1), 43-47.

Chavez-Galan L, Vesin D, Segueni N, Prasad P, Buser-Llinares R, Blaser G, , B. Ryffel, V.F.J.Quesniaux, I.Garcia. (2016). Tumor necrosis factor and its receptors are crucial to control *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin pleural infection in a murine model. *Am J Pathol.* 186(9):2364–77. doi:10.1016/j.ajpath.2016.05.015.

Chen H, He L, Cai C, Liu J, Jia J, Ma L, et al. (2018). Characteristics of distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lineages in China. *Science China Life Sciences.* 61: 651-659. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9243-0>

Chougar, L.; Amor, N.; Farjallah, S.; Harhoura, K.; Aissi, M.; Alagaili, A.N.;Merella P. (2019). New insight into genetic variation and haplotype diversity of *Fasciola hepatica* from Algeria. *Parasitol. Res.* 118, 1179–1192.

Cisse, B., Ekaza, A., N'guessan, K., Ouattara, I., & Dosso, M. (2008). Identification et caractérisation moléculaire des membres du complexe *Mycobacterium tuberculosis* en Côte d'Ivoire. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales.* RASPA Vol.6 N0 2, 2008.

Cissé, B., N'guessan, K., Ekaza, E., SORO, E., AKA, N., & DOSSO, M. (2008). Isolement de *Mycobacterium bovis* des lésions tuberculeuses chez les bovins à l'abattoir d'Abidjan Port-Bouët (Côte d'Ivoire). *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales.* RASPA Vol.6 N0 3-4.

Cleaveland, S., Shaw, D. J., Mfinanga, S. G., Shirima, G., Kazwala, R. R., Eblate, E., & Sharp, M. (2007). *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis*, 87(1), 30-43.

Coll F, McNerney R, Guerra-Assuncao JA, Glynn JR, Perdigao J, Viveiros M, et al. (2014). A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat. Commun.* 5:4812. <https://doi.org/10.1038/ncomms5812>

- Coll, F.; McNerney, R.; Preston, M.D.; Guerra-Assunção, J.A.; Warry, A.; Hill-Cawthorne, G.; Mallard, K.; Nair, M.; Miranda, A.; Alves, A.; et al. (2015). Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* 7, 51.
- Collins, C. H., Grange, J. M., & Yates, M. D. (1984). Mycobacteria in water. *Journal of Applied Bacteriology*, 57(2), 193-211.
- Collins, T., & Levett, P. N. (1989). Radiometric studies on the use of selective inhibitors in the identification of *Mycobacterium spp.* *Journal of medical microbiology*, 30(3), 175-181.
- Corner, L.A., Melville, L., McCubbin, K., Small, K.J., McCormick, B.S., Wood, P.R. and Rothel, J.S. (1990). Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust. Vet. J.*, 67: 389- 392.
- Cosivi, O., Grange, J. M., Daborn, C. J., Raviglione, M. C., Fujikura, T., Cousins, D., ... & Meslin, F. X. (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging infectious diseases*, 4(1), 59.
- Costello, E., Doherty, M. L., Monaghan, M. L., Quigley, F. C., & O'Reilly, P. F. (1998). A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *The Veterinary Journal*, 155(3), 245-250.
- Cousins D V. (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 20: 71–85.
- Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., ... & Bernardelli, A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1305-1314.
- Cowie, C. E., Hutchings, M. R., Barasona, J. A., Gortázar, C., Vicente, J., & White, P. C. (2016). Interactions between four species in a complex wildlife: livestock disease community: implications for *Mycobacterium bovis* maintenance and transmission. *European journal of wildlife research*, 62 (1), 51-64.

Crawshaw, TR, Griffiths, IB, Clifton-Hadley, RS. (2008). Comparison of a standard and a detailed postmortem protocol for detecting *Mycobacterium bovis* in badgers. *Vet Rec* 163:473–477.

Crozet G., et al. (2021). La tuberculose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Boehringer Ingelheim (Lyon), 114 p.

Crubézy, E., Ludes, B., Poveda, J. D., Clayton, J., Crouau-Roy, B., & Montagnon, D. (1998). Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 321(11), 941-951.

Cui, Z. L., Wang, J., Huang, X. C., Lu, J. M., & Hu, Z. Y. (2011). Fast identification of mycobacteria in microtiter liquid culture. *Zhonghua yu Fang yi xue za zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*, 45(1), 17-20.

Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Sostaric, B., Spicic, S., Obrovac, M., Marjanovic, S., ... & Vickovic, I. (2007). *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 11(6), 652-658.

« D »

Daffe, M., & Draper, P. (1997). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*, 39, 131-203.

Damene H, Tahir D, Diels M, Berber A, Sahraoui N, Rigouts L. (2020). Broad diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from humans and cattle in Northern Algeria suggests a zoonotic transmission cycle. *PLoS Negl Trop Dis* 14(11): e0008894. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894>.

Dao M. (2005). Contribution à l'étude de la tuberculose bovine au Mali : Enquête aux abattoirs de Bamako et de Mopti ; isolement de 10 souches de *Mycobacterium bovis* (Thèse de doctorat de Médecine vétérinaire, diplôme d'état). EISMV de Dakar: Sénégal, 84p.

De Groot MA, Huitt G. (2006). Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis*;42:1756_63.

De la Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Christiansen K.H. et Clifton-Hadley R.S. (2006b). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnosis techniques. *Research in Veterinary Science*. Vol. 81, pp. 190-210.

De La Rua-Domenech, R. (2006a). Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86, 77109. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>.

Dean, G. S., Clifford, D., Whelan, A. O., Tchilian, E. Z., Beverley, P. C., Salguero, F. J. et al. (2015). Protection induced by simultaneous subcutaneous and endobronchial vaccination with BCG/BCG and BCG/adenovirus expressing antigen 85A against *Mycobacterium bovis* in cattle. *PloS one*. 10 (11): e0142270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142270> PMID: 26544594.

Delafosse, A., Goutard, F., & Thebaud, E. (2002). Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abéché, Tchad. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 2002, 55 (1) : 5-13.

Delahay, R. J., Smith, G. C., Barlow, A. M., Walker, N., Harris, A., Clifton-Hadley, R. S., & Cheeseman, C. L. (2007). Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Vet. J.* 173(2): 287–301. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.11.011>.

Delnatte Andréa, Pauline, Geneviève, (2008). Etude de la tuberculose chez l'éléphant : importance en parc zoologique. Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. TOU 3 – 4014.

Demelash, B., Inangolet, F., Oloya, J., Asseged, B., Badaso, M., Yilkal, A., & Skjerve, E. (2009). Prevalence of bovine tuberculosis in Ethiopian slaughter cattle based on post-mortem examination. *Tropical animal health and production*, 41(5), 755-765.

Denis F., Martin C. (2007). *Mycobactéries IN : Bactériologie Médicale : technique usuelles*, Maisson Alfort, Paris, 467-488.

Diagne S.T. (2009). Contribution à l'étude de la tuberculose bovine aux abattoirs de Dakar (Sénégal) ; identification biochimique et biomoléculaire de 9 souches de mycobactéries sur 200101 carcasses inspectées de 2005 à 2008. Thesis, Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar. Available from <http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/TD09-22.dir/TD09-22.pdf>.

Diguimbaye Colette, 2004. La tuberculose humaine et animale au Tchad: Contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. Mémoire inaugurale pour l'obtention du titre de Docteur en Philosophie. Université de Bâle.

Djelouadji Z, Raoult D, Daffé M, Drancourt, M. (2008). A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. PLoS Negl Trop Dis. 2:e253. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000253>

Domingo, M.; Vidal, E.; Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*. v. 97, p. S20-S29.

Donnen Marie-Claire. (2011). Tuberculose à *Mycobacterium pinnipedii* chez un animal marin dans un zoo : Rôle du médecin du travail dans l'évaluation du risque de transmission à l'homme et dans la mise en place des mesures de prévention. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de médecine agricole. Institut National de Médecine Agricole.

Draper, P. (1998). The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci*, 3, D1253-D1261.

Duarte, E. L., Domingos, M., Amado, A., & Botelho, A. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary microbiology*, 130(3-4), 415-421.

Dubois Mélanie, Françoise, Sophie. (2002). Les tuberculoses chez l'animal et l'homme actualités épidémiologiques et diagnostiques. THESE : 2002 – TOU 3 – 4103. Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse.

Dumont Yann, Manon Lounnas, Christian Carrière, Jérôme Solassol, Anne-Laure Bañuls, Sylvain Godreuil. (2018). Bovine tuberculosis: a globalized disease at the human-animal interface. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 503: Pages 58-63.

Dupeyron Catherine (2008). Diagnostic biologique de la tuberculose. *Développement & santé*. <https://devsante.org/articles/diagnostic-biologique-de-la-tuberculose>

Dürr, S., Müller, B., Alonso, S., Hattendorf, J., Laise, C. J., Van Helden, P. D., & Zinsstag, J. (2013). Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(8), e2399.

« E »

Ejeh EF, Markus IF, Ejeh AS, Musa JA, Lawan FA, Ameh JA, Kudi AC, Cadmus SI. (2013). Seasonal prevalence of Bovine Tuberculous lesions in cattle slaughtered in Yola abattoirs. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 11(2):113–120. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v11i2.19125>.

Ejeh, E. F. *et al.* (2014). *Prevalence and direct economic losses from bovine tuberculosis in makurdi, Nigeria*. *Vet. Med. Int.* 2014, 904861.

El Khéchine A, Drancourt M. (2011). Diagnosis of pulmonary tuberculosis in a microbiological laboratory. *Med. Mal. Infect.* 41; 509-517. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2011.07.012>

El-Sayed A, El-Shannat S, Kamel M, Castañeda-Vazquez MA, Castañeda-Vazquez H (2016). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Humans and Cattle. *Zoonoses and Public Health* 63: 251–264. Pmid:26684712.

ENVF, Ecoles nationales vétérinaires françaises. La tuberculose. (1990). Lyon, France, 152 p.

Eroksuz Y, Baydar E, Otlu B, Dabak M, Eroksuz, H, Karabulut B, *et al.* (2019). Case report: systemic tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in a cat. *BMC Vet Res*. 15 (1):9. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1759-7>.

Erwin, P. C., Bemis, D. A., Mawby, D. I., McCombs, S. B., Sheeler, L. L., Himelright, I. M., ... & Thomsen, B. V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to canine. *Emerging infectious diseases*, 10(12), 2258.

« F »

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. canettii*”. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3248-3255.

Falkinham III, J. O., Norton, C. D., & LeChevallier, M. W. (2001). Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Applied and environmental microbiology*, 67(3), 1225-1231.

Falkinham JO (2004). *Environmental sources of Mycobacterium avium linked to routes of exposure*. In : Pedley S. et al. (eds), *Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management*. World Health Organization, IWA Publishing, London, UK, p.26-38.

FAO. (2012). Division de la production et de la santé animales. EMPRES Bulletin des maladies animales transfrontières. No. 40. ISSN 1814-1501. La tuberculose bovine à l’interface animal-homme-écosystème. www.fao.org/empres. Téléchargé le 02/10/2021 à partir de <http://www.fao.org/3/a-i2811f.pdf>

Faye S. (2010). Evaluation de nouveaux outils de diagnostic de la tuberculose bovine. Conditions d’utilisation d’un test de dosage de IFN γ et d’un test PCR IS6110 en temps réel. Thèse de doctorat. AgroPariTech, Maison Alfort.

Fediaevsky A. et Gay P. (2013). Tuberculose bovine : diagnostic de laboratoire post-mortem. Bureau de la santé animale. Note de service DGAL/SDSPA/N2013-8202 du 04 décembre 2013.

Fitzgerald, S. D., Hollinger, C., Mullaney, T. P., Bruning-Fann, C. S., Tilden, J., Smith, R., ... & Kaneene, J. B. (2016). Herd outbreak of bovine tuberculosis illustrates that route of infection correlates with anatomic distribution of lesions in cattle and cats. *J Vet Diagn Invest*. 28:129–132.

Flandrois J-P., Courcol R., Lemeland J-F., Ramuz M., Sirot J., Soussy C-J. (1997). *Mycobacterium tuberculosis*. Bactériologie médicale. P 152. ISBN : 2-7297-0567-8

Ford, C.B. et al. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. Nat. Genet. 45, 784–790.

FRANCO Diana, ROBLES Anayanci, JASMINE Ilse et MARTINEZ Dawn (2012). Tuberculosis. Bacteriologia.<http://cbtis7labclinico-bacte.blogspot.com/2012/04/tuberculosis.html>

Frankena K, White PW, O’Keeffe J, Costello E, Martin SW, Van Grevenhof I, More SJ. (2007). Quantification of the relative efficiency of factory surveillance in the disclosure of tuberculosis lesions in attested Irish cattle. Vet Rec. 161:679–84.

« G »

Gagneux S, DeRiemer K, Van t, Kato-Maeda M, De Jong BC, Narayanan S, et al. (2006). Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci.103: 2869-2873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511240103>

Gagneux, S, Small, PM. (2007). Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect Dis. 7: 328-337. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70108-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70108-1)

García-Barragán Á., Gutiérrez-Pabello J. A., Alfonseca-Silva E. (2018). Calcitriol increases nitric oxide production and modulates microbicidal capacity against *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 59: 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.001>.

Gathogo, S.M., Kuria, J.K.N. & Ombui, J.N., (2012). 'Prevalence of bovine tuberculosis in slaughter cattle in Kenya: a postmortem, microbiological and DNA molecular study', *Tropical Animal Health and Production* 44, 1739-1744.

Gebrezgabiher, G.; Romha, G.; Ameni, G. (2014). Prevalence study of bovine tuberculosis and genus typing of its causative agents in cattle slaughtered at Dilla Municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Afr. J. Basic Appl. Sci.*, 6, 103–109.

Gharnaout M, Bencharif N, Abdelaziz R, Douagui H. (2009). Tuberculose à *Mycobacterium bovis* : à propos de deux cas. *Rev. Mal. Respir.* 26, N° HS1: 141. Doi: RMR-01-2009-26-HS1-0761-8425-101019-200812406.

Giampaglia, C. M. S., Martins, M. C., Chimara, E., Oliveira, R. S., de Oliveira Vieira, G. B., Marsico, A. G., ... & da Silva, T. (2007). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with 3-nitrobenzoic acid using MGIT960. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 11(7), 803-807.

Godreuil S., C. Carrière, E. Jumas-Bilak, D. Terru, H. Marchandin. (2003). Diagnostic moléculaire des infections à mycobactéries. *La Lettre du Pneumologue - Volume VI - no 2 - mars-avril.* p72.

Gonzalez, J., Tudo, G., Gomez, J., Garcia, A., Navarro, M., & De Anta, M. J. (1998). Use of microscopic morphology in smears prepared from radiometric cultures for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium xenopi*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(7), 493-500.

Grace, G. A., Devaleenal, D. B., & Natrajan, M. (2017). Genital tuberculosis in females. *The Indian journal of medical research*, 145(4), 425.

Guillet-Caruba, C., Martinez, V., & Doucet-Populaire, F. (2014). Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. *La Revue de médecine interne*, 35(12), 794-800.

« H »

Hillemann, D., Weizenegger, M., Kubica, T., Richter, E., & Niemann, S. (2005). Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 3699-3703.

Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Pitzko, J. M., & Engelhardt, H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3963-3967.

Huitema, H., & Jaartsveld, F. H. J. (1967). *Mycobacterium microti* infection in a cat and some pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 33(1), 209-212.

Humblet, M. F., Boschioli, M. L., & Saegerman, C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Veterinary research*, 40(5), 1-24.

Hunt, M.; Bradley, P.; Lapierre, S.G.; Heys, S.; Thomsit, M.; Hall, M.B.; Malone, K.M.; Wintringer, P.; Walker, T.M.; Cirillo, D.M.; et al. (2019). Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with Mykrobe. *Wellcome Open Res.* 4, 191.

« I »

Ifticene, Malika, Gacem, Fatma Zohra, Yala, Djamel, et al. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* genotype Beijing: About 15 strains and their part in MDR-TB outbreaks in Algeria. *International journal of mycobacteriology*, vol. 1, no 4, p. 196-200.

Ifticene, Malika, Kaïdi, Saïd, khechiba, Mesbah-Mounir, et al. (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Algeria: Results of spoligotyping. *International journal of mycobacteriology*, vol. 4, no 4, p. 290-295.

Ignatova A, Dubiley S, Stepanshina V, Shemyakin I. (2006). Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. *J. Med. Microbiol.* 55:1413-1418. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46575-0>

Institut Pasteur. (2013). L'histoire évolutive et l'émergence de la tuberculose retracée. Consulté à partir ; <https://www.pasteur.fr/fr/histoire-evolutive-emergence-tuberculose-retracees>

« J »

Jawetz Ernest, Melnick Joseph L. et Adelberg Edward A. (1973). Mycobactéries. Microbiologie Médicale P239. ISBN 0-7746-6447-9.

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. *Veterinary Microbiology*, 151(1-2), 139-147.

Johnson, R., Jordaan, A. M., Pretorius, L., Engelke, E., Van Der Spuy, G., Kewley, C., ... & Victor, T. C. (2006). Ethambutol resistance testing by mutation detection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(1), 68-73.

Journal officiel de la république Algérienne N°12. Décret exécutif n°95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales a déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables. Téléchargé le 21/12/2020 à partir de <https://www.ecolex.org/details/legislation/decret-executif-no-95-66-fixant-la-liste-des-maladies-animales-a-declaration-obligatoire-et-les-mesures-generales-qui-leur-sont-applicables-lex-faoc064256/>

« K »

Kaur, D., Guerin, M. E., Škovierová, H., Brennan, P. J., & Jackson, M. (2009). Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in applied microbiology*, 69, 23-78.

Kent P. T., Kubica G. P. (1985). *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. US department of health and human services, public health service, Centers for Disease Control.

Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., Van Soolingen, D., & Koëter, G. (2008). Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 12(12), 1469-1473.

Kinne, J., Johnson, B., Jahans, K. L., Smith, N. H., Ul-Haq, A., & Wernery, U. (2006). Camel tuberculosis—a case report. *Tropical animal health and production*, 38(3), 207-213.

Koffi P. (1992). Contribution à l'étude de la tuberculose bovine au Togo. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire (diplôme d'état), Dakar, école inter états des sciences et médecine vétérinaire, 92p.

Kohl, T.A.; Utpatel, C.; Schleusener, V.; Filippo, M.R.D.; Beckert, P.; Cirillo, D.M.; Niemann S. (2018). MTBseq: A comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ*, 6, e5895.

Krajewska-Wędzina, M.; Didkowska, A.; Sridhara, A.A.; Elahi, R.; Johnathan-Lee, A.; Radulski, Ł.; Lipiec, M.; Anusz, K.; Lyashchenko, K.P.; Miller, M.A.; et al. (2020). Transboundary tuberculosis: Importation of alpacas infected with *Mycobacterium bovis* from the United Kingdom to Poland and potential for serodiagnostic assays in detecting tuberculin skin test false-negative animals. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 1306–1314.

Krishnan N, Malaga W, Constant P, Caws M, Thi Hoang Chau T, Salmons J, et al. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* Lineage Influences Innate Immune Response and Virulence and Is Associated with Distinct Cell Envelope Lipid Profiles. *PLoS ONE* 6(9): e23870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023870>

Kubica, G. P., Dye, W. E., Cohn, M. L., & Middlebrook, G. (1963). Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine—sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *American review of respiratory disease*, 87(5), 775-779.

Kubica, T., Agzamova, R., Wright, A., Rakishev, G., Rüscher-Gerdes, S., & Niemann, S. (2006). *Mycobacterium bovis* isolates with *M. tuberculosis* specific characteristics. *Emerging infectious diseases*, 12(5), 763.

Kuria JK, Akwalu SK, Muema LM. (2018). The etiology and public health significance of mycobacteriosis of cattle in Kenya. *Int J Mycobacteriol.* 7:251-6.

Kurniawardhani, A., Kurniawan, R., Muhimmah, I., & Kusumadewi, S. (2018). Study of colour model for segmenting *Mycobacterium tuberculosis* in sputum images. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 325, No. 1, p. 012010). IOP Publishing.

« L »

Lahlou, Ouafae, Millet, Julie, Chaoui, Imane, *et al.* (2012). The genotypic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Moroccan patients reveals a predominance of Euro-American lineages. *PloS one*, vol. 7, no 10, p. e47113.

Lamine-Khemiri H, Martínez R, García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Cortés M, Hurtado I, Mohammed Salah Abassi & Imed Khazri & Mohammed Benzarti & Javier Hermoso-de-Mendoza. (2014). Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium Bovis* and *Mycobacterium Caprae* isolates from cattle of Tunisia. *Trop Anim Health Prod.* 46:305–11.

Leao, S. C., A. Martin, G. I. Mejia, J. C. Palomino, J. Robledo, M. A. S. Telles, and F. Portaels. (2004). Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. *SECTION I – FUNDAMENTAL ASPECTS OF MYCOBACTERIAL IDENTIFICATION* Vanden Broelle, Bruges, Belgium.

Lim, A., Eleuterio, M., Hutter, B., Murugasu-Oei, B., and Dick, T. (1999) Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* 181: 2252–2256.

Liu, J. U. N., Rosenberg, E. Y., & Nikaido, H. (1995). Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11254-11258.

Liu, J., Barry, C. E., Besra, G. S., & Nikaido, H. (1996). Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 29545-29551.

Loiseau, C.; Menardo, F.; Aseffa, A.; Hailu, E.; Gumi, B.; Ameni, G.; Berg, S.; Rigouts, L.; Robbe-Austerman, S.; Zinsstag, J.; et al. (2020). An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evol. Med. Public Health*, 2020, 49–59.

Lombardi, G., Botti, I., Pacciarini, M. L., *et al.* (2017). Five-year surveillance of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in Bologna, Italy: an underestimated problem. *Epidemiology & Infection*, vol. 145, no 14, p. 3035-3039.

Lompo Boampoundi Yipan Amélie (2014). Etude des resistances primaire et secondaire du complexe tuberculosis aux anti-tuberculeux dans la region des hauts-bassins. Mémoire de Master. Université Polytechnique De Bobo-Dioulasso , Burkina Faso.

Long Richard, Victor Chernick, Kevin Elwood, David Haldane, Vernon Hoepner, Stanley Houston, Dick Menzies, Monika Naus, Howard Njoo et Wendy Wobeser. (2000). Les aspects bactériologiques de la tuberculose et des mycobactérioses. Aspects médicaux de la tuberculose. Normes canadiennes pour la lutte antituberculeuse. 5e édition. L'Association pulmonaire du Canada 2000 ISBN 0-9690661-7-1. Gouvernement du Canada ISBN 0-662-85184-6. P17.

Lopez, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., ... & Van Soolingen, D. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical & Experimental Immunology*, 133(1), 30-37.

Lorente-Leal V, Liandris E, Castellanos E, Bezos J, Domínguez L, de Juan, L, et al. (2019). Validation of a Real-Time PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members in Bovine Tissue Samples. *Front Vet Sci*. 6:6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00061> PMID: 30886855.

Loukil, A., Bouzid, F., Osman, D. A., & Drancourt, M. (2019). Decrypting the environmental sources of *Mycobacterium canettii* by high-throughput biochemical profiling. *Plos one*, 14(9), e0222078.

Lucas F., Moulin L., Haenn S., Desforges L., Cambau E. (2007). Action. Mycobactéries non tuberculeuses. *PIREN Rapport action MNT.doc*

« M »

M.A.D.R.P. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural et de la Pêche (2018). Cellule d'écoute et d'orientation. Statistiques agricoles. Cheptels. Téléchargé le 09/01/2021, à partir de <http://madrp.gov.dz/agriculture/statistiques-agricoles/>

M.A.D.R.P. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural et de la Pêche. Direction des Services Vétérinaires. Mise en place d'un système d'identification, d'enregistrement et de

suivi des animaux en Algérie. K .Boughalem CVO Algérie Alger, Algérie– 24 et 25 Novembre 2015. CPC/REMESA. Disponible en ligne: https://docplayer.fr/43882308-Dr-k-boughalem-cvo-algerie-alger-algerie-24-et-25-novembre-2015-cpc-remesa.html?fbclid=IwAR37DQnECLe-WWs85AseZi5iXI31I8cFkFxFUNkMbA5o19_FJdprpa-uPog (consulté le 19 février 2020).

M.S.P.R.H. Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. Direction de la Prévention. Programme National de Lutte Contre la Tuberculose Manuel de la lutte antituberculeuse [Internet]. 2011. <http://www.sante.dz> › manuel_tuber

Magee JG, Ward AC. Genus I. *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1896, 363^{AL}
In Goodfellow M, Kampfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K. *et al.* (editors) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. vol. 5 *The Actinobacteria, Part A* New York: Springer; 2012 pp. 312–375.

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*. *Journal of bacteriology*, 178(5), 1274-1282.

Maher D., Chaulet P., Spinaci S., Harries A. (1997). Le traitement de la tuberculose : principes à l'intention des programmes nationaux. Du Programme mondial de Lutte contre la Tuberculose. Organisation mondiale de la Santé Genève (Suisse). <https://www.who.int/docstore/gtb/publications/ttgnp/PDF/tb97f220.pdf>

Man, M. A., NiŢu, M. F., Strâmbu, L., Florescu, C., Streba, C. T., & Trofor, A. C. (2016). Tuberculous constrictive pericarditis complicated with tuberculous mediastinitis-case report. *Rom J Morphol Embryol*, 57(1), 237-242.

Manabe, Y. C., Scott, C. P., & Bishai, W. R. (2002). Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and immunity*, 70(3), 1566-1570.

Manuel de l'Institut Hospitalier Universitaire, Méditerranée Infection de Marseille (France). Formation biologie moléculaire. Avril, 2017.

Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, et al. (2004). Macroarray and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. 150: 483-496. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26662-0>

Marušić Ante and Janković Mateja. (2012). Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease, Pulmonary Infection, Dr. Amer Amal (Ed.), ISBN: 978-953-51-0286-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pulmonary-infection/nontuberculous-mycobacterial-pulmonary-disease>

Mathuria, J. P. (2009). Nanoparticles In Tuberculosis Diagnosis, Treatment And Prevention: A Hope For Future. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 4(2).

Maugein, J., & Bébéar, C. (2003). Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. *Médecine et maladies infectieuses*, 33, 153-158.

McKinley TJ, Lipschutz-Powell D, Mitchell AP, Wood JLN, Conlan AJK. (2018). Risk factors and variations in detection of new bovine tuberculosis breakdowns via slaughterhouse surveillance in Great Britain. *PLoS ONE* 13(6): e0198760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198760>.

Menzies, F. D., & Neill, S. D. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160(2), 92-106.

Merker, Matthias, Blin, Camille, Mona, Stefano, et al. (2015). Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nature genetics*, vol. 47, no 3, p. 242.

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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.029>.

Miltgen, J., Morillon, M., Koeck, J. L., Varnerot, A., Briant, J. F., Nguyen, G., ... & Vincent, V. (2002). Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis subsp. canetti*. *Emerging infectious diseases*, 8 (11), 1350.

Ministry of Agriculture, Food and Environment of Spain. Livestock Foreign Trade: MAPAMA's Role. Conference on the Export of Live Cattle to Third Countries. 2017. Available from: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/comercio-exterior/ganadero/01comercioexteriorganaderopapeldelmapama_tcm30-426534.pdf (accessed on 25 March 2020).

Minnikin, D. E., Kremer, L., Dover, L. G., & Besra, G. S. (2002). The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry & biology*, 9(5), 545-553.

Montali, R. J., Mikota, S. K., & Cheng, L. I. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Scientific and Technical Review, International Office of Epizootics*.

More SJ, Good M. (2006). *The tuberculosis eradication programme in Ireland: a review of scientific and policy advances since 1988*. *Vet. Microbiol.* 112, 239–251.

Moreira, M. A. S., Júnior, A. S., Lima, M. C., & da Costa, S. L. (2019). *Infectious Diseases in Dairy Cattle*. *Raw Milk*, 235 258. doi:10.1016/b978-0-12-810530-6.00011-0

Mostowy, S., Cousins, D., & Behr, M. A. (2004). Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of bacteriology*, 186(1), 104-109.

Mposhy M., Binemo-Madi C., Mudakikwa B. (1983). Incidence de la tuberculose bovine sur la santé des populations du Nord-Kivu (Zaire). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 36, 15-18.

Müller, B., B. Steiner, B. Bonfoh, A. Fané, N. Smith, and J. Zinsstag. (2008). Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC Vet. Res.* 4, 1–6.

Musoke, J., Hlokwe, T., Marcotty, T., Du Plessis, B. J., & Michel, A. L. (2015). Spillover of *Mycobacterium bovis* from wildlife to livestock, South Africa. *Emerging infectious diseases*, 21(3), 448.

« N »

Nacef L, Haddad L, Graba L, Mesbah S, Saighi O. (2015). Profil épidémiologique de la tuberculose dans une wilaya du centre d'Algérie. *Rev. Mal. Respir.* 32 :A226. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.10.360>

Nakajima C, Rahim Z, Fukushima Y, Sugawara I, van der Zanden, AGM, Tamaru A, et al. (2010). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Bangladesh by a species distinguishable multiplex PCR. *BMC Infect Dis.* 10:118. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-118>

Namouchi, Amine, Karboul, Anis, Mhenni, Besma, et al. (2008). Genetic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* in Tunisia: predominance and evidence for the establishment of a few genotypes. *Journal of medical microbiology*, vol. 57, no 7, p. 864-872.

Narayanan S, Gagneux S, Hari L, Tsolaki AG, Rajasekhar S, Narayanan PR, et al. (2008). Genomic interrogation of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* from south India. *Infect Genet Evol.* 8: 474-483. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.09.007>

Narvaiz de Kantor, Isabel, Kim, Sang Jae, Frieden, Thomas R, Laszlo, Adalbert, Luelmo, Fabio. et al. (1998). Laboratory services in tuberculosis control / writing committee: Isabel Narvaiz de Kantor ... [et al.]. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65942>

Narvaiz de Kantor, Isabel, Kim, Sang Jae, Frieden, Thomas R, Laszlo, Adalbert, Luelmo, Fabio. et al. (1998). Laboratory services in tuberculosis control / writing committee: Isabel Narvaiz de Kantor ... [et al.]. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65942>

Nebreda-Mayoral T, Brezmes-Valdivieso M. F, Gutiérrez-Zufiaurre N, García-de Cruz S, Labayru-Echeverría C, López-Medrano R, et al. (2019). Human *Mycobacterium bovis* infection in Castile and León (Spain), 2006–2015. *Enferm Infecc Microbiol Clin. (English ed.)*. 37(1):19-24. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2018.10.001>.

Nedjraoui D. (2003). Profil fourrager – Algérie. Document FAO. Téléchargé le 09/01/2021 à partir de <https://docplayer.fr/43954805-Profil-fourrager-algerie-par-d-nedjraoui.html>.

Ngandolo B.N., C. Diguimbaye-Djaibé B. Müller L. Didi M. Hilty I. Schiller E. Schelling B. Mobeal B.S. Toguebaye A.J. Akakpo J. Zinsstag. (2009). "Diagnostics ante et post mortem de la tuberculose bovine au sud du Tchad: cas des bovins destinés à l'abattage," *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* 62 (1) : 5-12.

Niemann, S., E. Richter, et S. Rusch-Gerdes. 2002a. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* Aranaz et al. (1999) to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis subsp. caprae* comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 52:433-436.

Niemann, S., Kubica, T., Bange, F. C., Adjei, O., Browne, E. N., Chinbuah, M. A., ... & Rusch-Gerdes, S. (2004). The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. *Journal of clinical microbiology*, 42(9), 3958-3962.

Niemann, S., Richter, E., & Rüscher-Gerdes, S. (2000). Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 152-157.

Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Joloba, M. L., Whalen, C. C., Guwatudde, D., Ellner, J. J., ... & Schwander, S. K. (2002b). *Mycobacterium africanum* subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3398-3405.

Nigsch A, Luginbühl A, Briner A, Suter D. (2014). Anomalies décelables lors du contrôle des viandes. Manuel de dépistage de la tuberculose bovine. *Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires*, Berne (Suisse), 22p.

Nikaido, H., Kim, S. H., & Rosenberg, E. Y. (1993). Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Molecular microbiology*, 8(6), 1025-1030.

Ninet, B., Roux-Lombard, P., Schrenzel, J., & Janssens, J. P. (2011). Nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose. *Revue des maladies respiratoires*, 28(6), 823-833.

Niobe-Eyangoh, S. N., Kuaban, C., Sorlin, P., Cunin, P., Thonnon, J., Sola, C., ... & Gutierrez, M. C. (2003). Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2547-2553.

Nițu, F. M., Olteanu, M., Streba, C. T., Jimborean, G., Postolache, P., Man, M. A., ... & Olteanu, M. Ȃ. D. Ȃ. L. I. N. A. (2017). Tuberculosis and its particularities in Romania and worldwide. *Rom J Morphol Embryol*, 58(2), 385-92.

Nolte F. and Metchock B. (1995): *Mycobacterium*. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F. C. Tenover and R.H. Tenover (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.400-437.

Nwanta JA, Umeononigwe CN, Abonyi GE and Onunkwo JI (2011). Retrospective study of bovine and human tuberculosis in abattoirs and hospitals in Enugu State, Southeast Nigeria. *Journal of public health and epidemiology*, 3(7): 329 – 336.

« O »

Okeke, LA., Fawole, O., Muhammad, M., Okeke, I.O., Nguku, P., Wasswa, P., Dairo, D. and Cadmus, S. (2016). Bovine tuberculosis: A retrospective study at Jos abattoir, Plateau State, Nigeria. *Pan-Afri. med. J.*, 25: 202.

Oloya, J., Kazwala, R., Lund, A., Opuda-Asibo, J., Demelash, B., Skjerve, E., ...& Djønne, B. (2007). Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. *BMC microbiology*, 7(1), 1-7.

Omae Y, Toyo-Oka L, Yanai H, Nedsuwan S, Wattanapokayakit S, Satproedprai N, et al. (2017). Pathogen lineage-based genome-wide association study identified CD53 as susceptible locus in tuberculosis. *J. Hum. Genet.* 62:1015-1022. <https://doi.org/10.1038/jhg.2017.82>

Orduz Magda Lorena and Ribón Wellman. (2015). Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *Medicine » Infectious Diseases » "Tuberculosis - Expanding Knowledge"*, book edited by Wellman Ribon , ISBN 978-953-51-2139-8, Published: July 8, under CC BY 3.0 license. DOI: 10.5772/59751.

Ozyigit, M. O., Senturk, S., & Akkoc, A. (2007). Suspected congenital generalised tuberculosis in a newborn calf. *The Veterinary record*, 160(9), 307.

« P »

Page AJ, Taylor B, Delaney AJ, Soares J, Seemann T, Keane JA, et al. (2016). SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microb Genom.* 2:e000056. doi: 10.1099/mgen.0.000056.

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), 853-858.

Panteix G. (2007). Mycobactéries Tuberculeuses. Précis de Bactériologie Clinique sous la direction de Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P.. Editions, ESKA. Vol. 72, pp. 1253-1266.

Parwati, Ida, Van Crevel, Reinout, et Van Soolingen, Dick. (2010). Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *The Lancet infectious diseases*, vol. 10, no 2, p. 103-111

Pattyn, S. R., Portaels, F., & Spanoghe, L. (1970). Further studies on African strains. *Ann. Soc. Belge Med. Trop*, 50(2), 211-228.

Pavlik, I.; Machackova, M.; Yayo Ayele, W.; Lamka, J.; Parmova, I.; Melicharek, I.; Hanzlikova, M.; Körmendy, B.; Nagy, G.; Cvetnic, Z.; et al. (2002). Incidence of bovine tuberculosis in wild and domestic animals other than cattle in six Central European countries during 1990–1999. *Vet. Med.-Praha*. 47, 122–131.

Pavulraj. S. Uterus -Endometrium contains numerous raised tubercles Friday, October 18, 2013, M.V.Sc., Pathology scholar, IVRI (NRCE), India 12. In: <https://image.slidesharecdn.com/commoncattlediseasesbydr-131018023958-phpapp01/95/common-cattle-diseases-by-drpavulrajs-mvsc-pathology-scholar-ivri-nrce-india-12-638.jpg?cb=1382064243>

Petroff, S. A. Some cultural studies on the tubercle bacillus. Bull. Johns Hopkins Hosp. (1915). 26: 276-279.

Pfyffer, G. E., Welscher, H. M., & Kissling, P. (1997). Pretreatment of clinical specimens with sodium dodecyl (lauryl) sulfate is not suitable for the mycobacteria growth indicator tube cultivation method. *Journal of clinical microbiology*, 35(8), 2142-2144.

Pickup, R. W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T. J., Weightman, A., ... & Hermon-Taylor, J. (2005). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 2130-2139.

Piddington, D. L., Kashkouli, A., & Buchmeier, N. A. (2000). Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg²⁺ levels. *Infection and Immunity*, 68(8), 4518-4522.

Pilet Ch., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N. and Balbastre C. (1979). Bactériologie médicale et vétérinaire. 2ème édition. A. Oubrè & R. Buttiaux (eds.). DOIN éditeurs. Paris. 438p.

Pittius, N. C. G. V., Perrett, K. D., Michel, A. L., Keet, D. F., Hlokwe, T., Streicher, E. 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. *Journal of wildlife diseases*, 48(4), 849-857.

Pollock, J. M., Rodgers, J. D., Welsh, M. D., & McNair, J. (2006). Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), 141-150.

Pollock, J.M., Neill, S.D. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and Tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*. 163, 115-127.

Proaño-Pérez, F., Benitez-Ortiz, W., Desmecht, D., Coral, M., Ortiz, J., Ron, L. & Linden, A. (2011). Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(1-2), 65-72.

Probst, C., Freuling, C., Moser, I., Geue, L., Köhler, H., Conraths, F. J., ... & Kramer, M. (2011). Bovine tuberculosis: making a case for effective surveillance. *Epidemiology & Infection*, 139(1), 105-112.

« Q »

Qie, Y. Q., Wang, J. L., Liu, W., Shen, H., Chen, J. Z., Zhu, B. D., ... & Wang, H. H. (2009). More Vaccine Efficacy Studies on the Recombinant Bacille Calmette-Guerin Co-expressing Ag85B, Mpt64190–198 and Mtb8. 4. *Scandinavian journal of immunology*, 69(4), 342-350.

Quirin, R., Rasolofo, V., Andriambololona, R., Ramboasolo, A., Rasolonavalona, T., Raharisolo, C., ... & Boisier, P. (2001). Validity of intradermal tuberculin testing for the screening of bovine tuberculosis in Madagascar. *Onderstepoort journal of veterinary research*, 68: 231-238.

« R »

Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., & Cook, G. M. (2001). Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology*, 147(4), 1017-1024.

Rastogi, N., Legrand, E., & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 20(1), 21-54.

Refaya, A. K., Bhargavi, G., Mathew, N. C., Rajendran, A., Krishnamoorthy, R., Swaminathan, S., & Palaniyandi, K. (2020). A review on bovine tuberculosis in India. *Tuberculosis*, 122, 101923.

Rishi, S., P. Sinha, B. Malhotra, and N. Pal. (2007). A comparative study for the detection of mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Löwenstein-Jensen media and direct AFB smear examination. *Indian J. Med. Microbiol.* 25: 383-386.

Rodríguez E, Sánchez LP, Pérez S, Herrera L, Jiménez MS, Samper S, et al. (2009). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13: 1536-1541.

Romero-Montoya M, Beltran-Alzate JC, Cardona-Castro N (2017) Evaluation and Monitoring of *Mycobacterium leprae* Transmission in Household Contacts of Patients with Hansen's Disease in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 11(1): e0005325. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005325>

Rouse, B. T., & Sehrawat, S. (2010). Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome?. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 514-526.

« S »

Sadoud, Mohamed. (2019). Perception de la viande ovine par le consommateur de la région de Tiaret en Algérie. *Viandes & Produits Carnés*, p. 1.

Sahraoui N., Muller B., Mamache B., Yala D., Boulahbal F., Zinsstag J et Guetarni D. (2011b). "Tuberculosis in cattle and Goats in the North of Algeria," *Veterinary Research*, vol. 4, no. 4, pp. 100–103.

Sahraoui, N., Müller, B., Guetarni, D., Boulahbal, F., Yala, D., Ouzrout, R., Berg, S., Smith, N.H., Zinsstag, J. (2009). Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Vet. Res.* 5,4. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-4>

Sahraoui, N., Muller, B., Yala, D., Ouzrout, R., Zinsstag, J., Boulahbal, F. and Guetarni, D. (2008). Investigation about the bovine tuberculosis in two Algerian slaughterhouses. *African Journal of Agricultural Research*, 3, 775–778.

Sahraoui, N., Zelleg, S., Yousfi, N., Zinsstag, J., & Guetarni, D. (2011a). Survey on tuberculosis goats in two slaughterhouses in Algeria. *African Journal of Agricultural Research*, 6(32), 6741-6744.

Sani, M., Houben, E. N., Geurtsen, J., Pierson, J., De Punder, K., van Zon, M., ... & Peters, P. J. (2010). Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS pathogens*, 6(3), e1000794.

Sanou, A., Tarnagda, Z., Kanyala, E., Zingué, D., Nouctara, M., Ganamé, Z., ... & Godreuil, S. (2014). *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10), e3142.

Schmitt, S. M., Fitzgerald, S. D., Cooley, T. M., Bruning-Fann, C. S., Sullivan, L., Berry, D., ... & Sikarskie, J. (1997). Bovine tuberculosis in free-ranging white-tailed deer from Michigan. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(4), 749-758.

Schwander, S., Rüsç-Gerdes, S., Mateega, A., Lutalo, T., Tugume, S., Kityo, C., ... & Dietrich, M. (1995). A pilot study of antituberculosis combinations comparing rifabutin with rifampicin in the treatment of HIV-1 associated tuberculosis: a single-blind randomized evaluation in Ugandan patients with HIV-1 infection and pulmonary tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*, 76(3), 210-218.

Serrano Miriam , Iker A. Sevilla, Miguel Fuertes, Mariví Geijo, Maria Ángeles Riscalde, Jose Francisco Ruiz-Fons, Christian Gortazar, Ramón A. Juste, Lucas Domínguez, Natalia Elguezabal and Joseba M. Garrido (2018). Different lesion distribution in calves orally or intratracheally challenged with *Mycobacterium bovis*: implications for diagnosis. *Vet Res* 49:74 <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0566-2>.

Sharma, B., Pal, N., Malhotra, B., & Vyas, L. (2010). Evaluation of a rapid differentiation test for *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria by selective inhibition with p-nitrobenzoic acid using MGIT 960. *Journal of laboratory physicians*, 2(02), 089-092.

Sharma, S. K., & Mohan, A. (2004). Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*, 120(4), 354-376.

Shinnick TM, Good RC. (1995). Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin Infect Dis*; 21(2):291_9.

Sieng, Marivan. (2011). La Détection de la tuberculose bovine dans les abattoirs du Sud-Ouest de 2001 à 2010 : analyse des données d'inspection et des résultats histologiques et bactériologiques. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse- ENVT, 64p.

Snider, W. R. (1971). Tuberculosis in canine and feline populations: Review of the literature. *American Review of Respiratory Disease*, 104(6), 877-887.

Solatges Chloé. (2008). Les dermatoses provoquées par les mycobactéries chez les carnivores domestiques. ANNEE 2008 THESE : 2008 – TOU 3 – 4093.

Sorlozano, Antonio, Soria, Isabel, Roman, Juan, *et al.* (2009). Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol*, vol. 19, no 10, p. 1259-1264.

Steiner A, Stucki D, Coscolla M, Borrell S, Gagneux S. (2014). KvarQ: targeted and direct variant calling from fastq reads of bacterial genomes. *BMC Genomics*. 15:881. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-881>

Stevens Alan, Lowe James S. (2002). Young Barbara. Anatomie pathologique, atlas de Wheater, anatomie pathologique générale. Infections à mycobactéries. 4eme édition. ISBN 0443-07001-6.

Sunder, Simon, Lanotte, P., Godreuil, S., *et al.* (2009). Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *Journal of clinical microbiology*, vol. 47, no 4, p. 1249-1251.

« T »

Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D. B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., ... & Boshoff, H. I. (2012). SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of tréhalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 1797-1809.

Talbot Elizabeth A. and Raffa Brittany J. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*. PART 15 Mycobacterial Infections. Chapter 92 *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Medical Microbiology*. p 1639. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00092-5>

Tanner M., Michel A.L. (1999). Investigation of the viability of *M. bovis* under different environmental conditions in the Kruger National Park. *In: J. Vet. Res.*, Vol. 66(3), p.185-190.

Tarnagda, Z., Kanyala, E., Zingué, D., Sidibé, S., Yougbaré, I., Méda, T. K. N., ... & Carabin, H. (2014). Prevalence of Tuberculosis spp. species in bovine carcasses in two slaughterhouses of Burkina Faso. *Int Microbiol Immunol Res*, 2, 92-100.

Tazerart, F.; Saad, J.; Niar, A.; Sahraoui, N.; Drancourt, M. (2021). *Mycobacterium bovis* Pulmonary Tuberculosis, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 972.

Teklu A, Asseged B, Yimer E, Gebeyehu M, Woldesenbet Z. (2004). Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. *Rev Sci Tech.* 23: 957-964.

Terefe dechassa. (2014). Gross pathological lesions of bovine tuberculosis and efficiency of meat inspection procedure to detect-infected cattle in Adama municipal abattoir. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health.* vol. 6, no 2, p. 48-53.

Tohen, C. O., LoBue, P. A., Enarson, D. A., Kaneene, J. B., & de Kantor, I. N. (2009). Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans.

Tohen, Charles, Lobue, Philip, et De Kantor, Isabel. (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary microbiology*, vol. 112, no 2-4, p. 339-345.

Thorel Marie Françoise, 2003. Tuberculose. In Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail (Europe et régions chaudes). Coordinateurs : Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R., Uilonberg G., chapitre 75, p. 927-949.

Thys, E., H. Schiere, G. Van Huylbroeck, A. Mfoukou-Ntsakala, M. Ouedraogo, and S. Geerts (2006). Three approaches for the integrated assessment of urban household livestock production systems: cases from Sub-Saharan Africa. *Outlook Agr.* 35, 7–18.

Torres-Gonzalez, Pedro, Cervera-Hernandez, Miguel E., Martinez-Gamboa, Areli, *et al.* (2016). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: a retrospective comparison with *Mycobacterium tuberculosis* in a Mexican tertiary care centre, 2000–2015. *BMC infectious diseases*, vol. 16, no 1, p. 657.

Toure-Sissoko Fatoumata M. (2009). La Problématique de La mise en œuvre de La culture du bacille de Koch dans le laboratoire national de référence de la tuberculose du Mali (LNR).

Thèse ; La Faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie. Université de Bamako.

Tram TTB, Nhung HN, Vijay S, Hai HT, Thu DDA, Ha VTN, et al. (2018). Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Is Associated With Sputum Pre-treatment Bacterial Load, Lineage, Survival in Macrophages, and Cytokine Response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8: 417. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00417>

Tsukamura, M., & Tsukamura, S. (1965). *Identification of Mycobacterium tuberculosis and of Mycobacterium bovis by Five in vitro Tests. Nippon Saikingaku Zasshi, 20(12), 689–692.* doi:10.3412/jsb.20.689.

« U »

U.I.C.T.M.R. Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires. GUIDE TECHNIQUE. Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus. Cinquième édition, 2000. 68 boulevard Saint Michel, 75006 Paris, France.

« V »

Van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., ... & Shinnick, T. M. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology, 31(2), 406-409.*

Van Helden, P. D., Parsons, S. D., & Gey van Pittius, N. C. (2009). 'Emerging' mycobacteria in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association, 80(4), 210-214.*

Van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., De Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., ... & Van Embden, J. D. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47(4), 1236-1245.*

Van Soolingen, D., Van Der Zanden, A. G., De Haas, P. E., Noordhoek, G. T., Kiers, A., Foudraine, N. A., ... & van Embden, J. D. (1998). Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), 1840-1845.

Varshney, S., Gupta, P., Bist, S. S., Singh, R. K., & Gupta, N. (2009). Lupus vulgaris of nose. *J Med Educ Res*, 11, 91-3.

Viana-Niero, C., Gutierrez, C., Sola, C., Filliol, I., Boulahbal, F., Vincent, V., & Rastogi, N. (2001). Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS 6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 57-65.

Virgin, H.W., Wherry, E.J. & Ahmed, R. (2009). *Redefining chronic viral infection*. *Cell* 138, 30–50.

Vrain Alisson (2010). Séquençage du gène pncA : Installation au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges Application à quatre isolats résistants au pyrazinamide. Thèse. Université de Limoges.

« W »

Wadhwa, A., Hickling, G. J., & Eda, S. (2012). Opportunities for improved serodiagnosis of human tuberculosis, bovine tuberculosis, and paratuberculosis. *Veterinary medicine international*, 2012.

Waecker Jr, N. J., Stefanova, R., Cave, M. D., Davis, C. E., & Dankner, W. M. (2000). Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin to children receiving cancer therapy and to their health care providers. *Clinical infectious diseases*, 30(2), 356-362.

Wang, L., Slayden, R. A., Barry, C. E., & Liu, J. (2000). Cell wall structure of a mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7224-7229.

Wayne LG, Kubica GP. The mycobacteria. In: Sneath PHA and Holt JG, editors. *Bergeys manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins Co.; 1986. p. 1435–57.

Wedlock, D.N., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Buddle, B.M. (2002). Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microb. Infect.* 4, 471–480.

Wells, A. Q. (1937). Tuberculosis in wild voles. *Lancet* i:1221.

Whipple, D. L., Bolin, C. A., & Miller, J. M. (1996). Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(3), 351-354.

Wilkins, M. J., Meyerson, J., Bartlett, P. C., Spieldenner, S. L., Berry, D. E., Mosher, L. B., ... & Boulton, M. L. (2008). Human *Mycobacterium bovis* infection and bovine tuberculosis outbreak, Michigan, 1994–2007. *Emerging infectious diseases*, 14(4), 657.

World Organisation for Animal Health. Bovine tuberculosis. 2020. [cited 2020 Feb 19]. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/bovine317tuberculosis/#A>

« Y »

y García, J. S., Bigi, M. M., Klepp, L. I., García, E. A., Blanco, F. C., & Bigi, F. (2020). Does *Mycobacterium bovis* persist in cattle in a non-replicative latent state as *Mycobacterium tuberculosis* in human beings?. *Veterinary Microbiology*, 247, 108758.

Yahyaoui-Azami Hind , Hamid Aboukhassib, Mohammed Bouslikhane, Jaouad Berrada, Soukaina Rami, Miriam Reinhard, Sebastien Gagneux, Julia Feldmann, Sonia Borrell and Jakob Zinsstag. (2017). Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco. *BMC Veterinary Research* BMC series – open, inclusive and trusted. 13:272. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1165-6>.

Yang, C.; Luo, T.; Shen, X.; Wu, J.; Gan, M.; Xu, P.; Wu, Z.; Lin, S.; Tian, J.; Liu Q.; et al. (2017). Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China: A retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation. *Lancet Infect. Dis.* 17, 275–284.

Youssef, A.I. and Ahmed, A.M. (2014). Bovine tuberculosis survey based on meat inspection and microscopic examination in central city abattoir in Ismailia, Egypt and its hazards to abattoir workers. *International Food Research Journal*, 21(2), 577--582.

« Z »

Zachariah A, Pandiyan J, Madhavalatha GK, Mundayoor S, Chandramohan B, et al. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* in wild Asian elephants, southern India. *Emerg Infect Dis.* 23:504–506. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.161741>

Zenteno-Cuevas R, Silva-Hernández FX, Mendoza-Damián F, Ramírez-Hernández MD, Vázquez-Medina K, Widrobo-García L, et al. (2013). Characterisation of pks15/1 in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 108:718-723. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276108062013007>

Zhao, J. R., Bai, Y. J., Wang, Y., Zhang, Q. H., Luo, M., & Yan, X. J. (2005). Development of a pyrosequencing approach for rapid screening of rifampin, isoniazid and ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9(3), 328-332.

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. *Journal of bacteriology*, 190(16), 5672-5680.

Production scientifique



Emerg Infect Dis. 2021 Mar; 27(3): 972–974.

PMCID: PMC7920681

doi: [10.3201/eid2703.191823](https://doi.org/10.3201/eid2703.191823)

PMID: [33622469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33622469/)

***Mycobacterium bovis* Pulmonary Tuberculosis, Algeria**

[Fatah Tazerart](#), [Jamal Saad](#), [Abdellatif Niar](#), [Naima Sahraoui](#),¹ and [Michel Drancourt](#)

Université Ibn Khaldoun de Tiaret, Tiaret, Algeria (F. Tazerart);

Université de Blida, Blida, Algeria (F. Tazerart, N. Sahraoui);

Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille, France (F. Tazerart, J. Saad, M. Drancourt);

Aix-Marseille-University, Marseille (J. Saad, M. Drancourt);

Laboratoire de Reproduction des Animaux de la Ferme, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, Tiaret (A. Niar)

 Corresponding author.

Address for correspondence: Michel Drancourt, Aix Marseille Université, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, 19-21 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France; email: michel.drancourt@univ-amu.fr

[Copyright notice](#)

Abstract

We analyzed 98 *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates collected in 2 regions of Algeria in 2015–2018 from 93 cases of pulmonary tuberculosis. We identified 93/98 isolates as *M. tuberculosis* lineage 4 and 1 isolate as *M. tuberculosis* lineage 2 (Beijing). We confirmed 4 isolates as *M. bovis* by whole-genome sequencing.

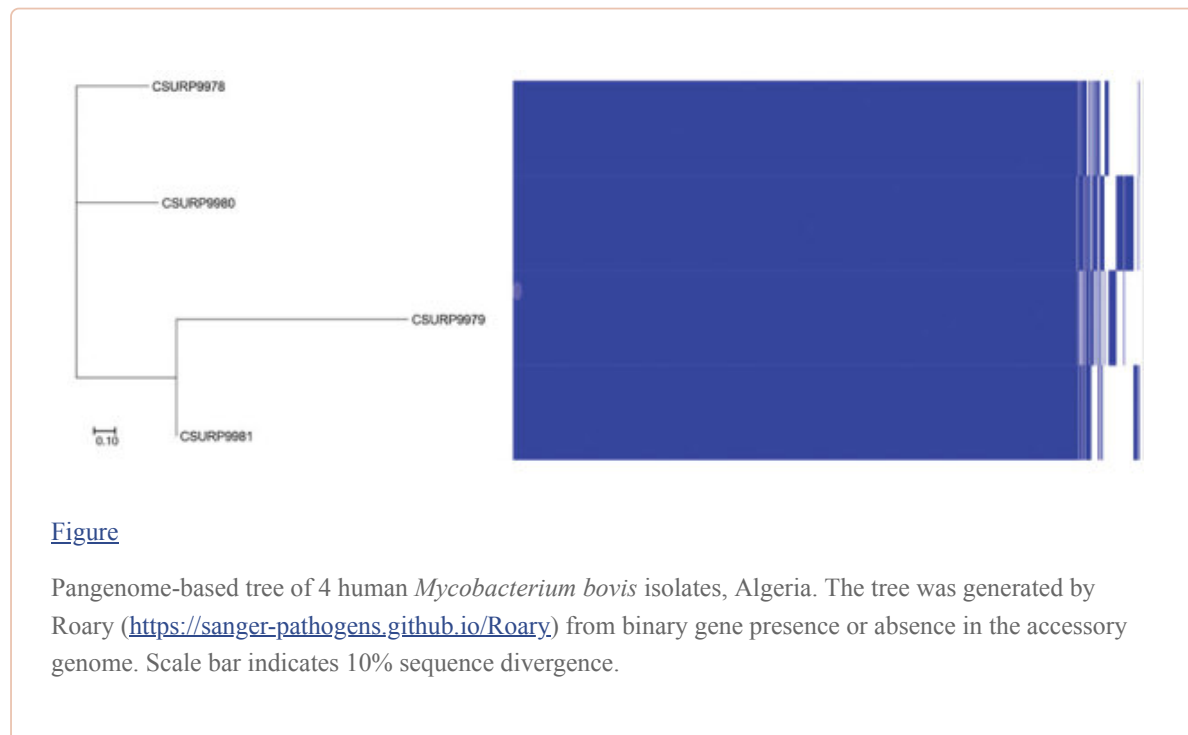
Keywords: tuberculosis and other mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, whole-genome sequencing, Algeria, bacteria

In Algeria, interpreting tuberculosis (TB) incidence, estimated at 53–88 cases/100,000 population in 2017 ([1](#)), is limited by the fact that the diagnosis relies on microscopic examination of clinical samples. Isolates are presumptively identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex based on colony phenotype.

We analyzed 98 sputum isolates identified as *M. tuberculosis* complex by 5 Tuberculosis and Respiratory Disease Control Service facilities in 2015–2018 ([Appendix](#) Table 1, Figure,). Exact tandem repeat D analysis ([2](#)) confirmed these 98 isolates as *M. tuberculosis* complex. Large-sequence polymorphism analysis using PCR sequencing of genomic regions RD105, RD239, and RD750 and of the polyketide synthase gene *pks15/1* ([3](#)) yielded 88 (89.8%) *M. tuberculosis* sensu stricto Euro-American lineage 4 isolates and 1 East Asian lineage 2 (Beijing) isolate. Whole-genome sequencing (WGS) of 5 RD deletion-free unidentified isolates indicated that these 5 isolates, P9982(ERR3588223), P9983(ERR3588225), P9985(ERR3588243), P9984(ERR3588246), and P9986(ERR3588247), were *M. tuberculosis* sensu stricto Euro-American lineage 4. We conducted WGS analysis using TB-profiler for *M. tuberculosis* online tool (<https://tbdr.lshtm.ac.uk/upload>) for lineage and sublineage determination. Altogether, *M. tuberculosis* lineage 4 was the predominant lineage in the 5 Algerian departments and the sole lineage documented in Bgayet, Tizi-Ouzou, and Medea ([Appendix](#) Table 2); it was found to be the cause of pulmonary TB in 79/93 (85%) cases, pleural TB in 11 (12%) cases, and lymph node TB in 3 (3%) cases. These observations updated those issued from a previous study conducted in 14 departments including 114 (88%) cases of pulmonary localization and 15 cases (12%) of extrapulmonary localization ([4](#)). In a later study, spoligotyping revealed that most isolates belonged to *M. tuberculosis* Euro-American lineage 4; the Haarlem clade accounted for 29.5% of studied isolates; the Latin American-Mediterranean clade, 25.6%; and the T clade, 24.8% ([4](#)). In our study, 1 *M. tuberculosis* Beijing strain was isolated from a bronchial fluid

sample collected in Blida from the location at which 15 *M. tuberculosis* Beijing isolates had been identified \approx 10 years earlier from 14 workers from Algeria and 1 from China (5). Our observation suggests that 10-year circulation of *M. tuberculosis* Beijing strain in the community in Blida area most probably followed immigration of workers from China employed in the construction sector.

WGS analysis of 4 additional isolates exhibiting a 6-bp deletion in the *pks15/1* gene identified them as *M. bovis*. Using a Roary pangenome pipeline (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary>), we found that *M. bovis* CSURP9981 grouped with *M. bovis* CSURP9979 and that *M. bovis* CSURP9980 grouped with *M. bovis* CSURP9978 (Figure). Further analysis based on the 3,732,808-bp core genome detected 3,761-bp (0.1%) of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) between the 4 isolate genomes. Whole-genome sequences of *M. bovis* strains in the study have been deposited in GenBank (sequence P9978, accession no. ERR3587501; P9979, no. ERR3587591; P9980, no. ERR3587597; and P9981, no. ERR3588222).



All 4 patients had pulmonary TB and had no detectable lymph node swelling and no scrofula (6). Two case-patients in Blida were a 27-year-old unemployed man and a 60-year-old taxi driver who both declared that they did not consume raw milk and had no contacts with cattle; a neighbor of the 60-year-old patient was a butcher with whom he spent a lot of time. Two case-patients in Ain Defla were 18-year-old and 43-year-old housewives living in 2 different rural areas. The interviews of these patients did not reveal contacts with cattle. Identification of human cases of *M. bovis* was unexpected because in 50 years, only 7 cases of *M. bovis* human infection have been reported in Algeria: 3 cases of pulmonary TB and 2 cases of cervical lymphatic TB detected in a total of 1,183 (0.4%) phenotypically identified *M. bovis* isolates (7), and 2 additional cases reported in 2009 (8).

M. bovis TB is clinically, pathologically, and radiologically indistinguishable from *M. tuberculosis*; diagnosis requires accurate identification of the causative mycobacterium, most efficiently by using WGS. Our report illustrates pitfalls in precisely tracing the natural history of *M. bovis* TB in patients, including sources, routes of transmission, and primary route of entry, which may determine the pathology of the infection. Zoonotic *M. bovis* TB was most often transmitted to humans by the consumption of *M. bovis*-contaminated dairy products that caused lymphatic TB, eventually becoming pulmonary TB (9). We previously reported a hidden circumstance for contacts with *M. bovis*-infected animals, tracing 1 *M. bovis* pulmonary TB case in a patient in Tunisia to contacts with an infected sheep during religious festivities in 2018 (10). In the case we report here, foodborne transmission cannot be ruled out, but it is possible that this may be a rare case of aerosol transmission.

Algeria is a bovine TB–enzootic country. We recommend comparing the genome sequences from the 4 patients reported here with those of future bovine isolates in the same departments to trace zoonotic *M. bovis* TB in Algeria and contribute to the understanding of its natural history.

Appendix:

Additional information about *Mycobacterium bovis* pulmonary tuberculosis in Algeria.

[Click here to view.](#)^(95K, pdf)

Acknowledgments

We thank Graba L., Lamri Zahir, Cherair Ali, and Kerrouche Moussa and those who are responsible for the Tuberculosis and Respiratory Disease Control Service facilities of Tizi Ouzou for their valuable assistance. We also thank Mohamed Rahal, Asma Aiza, and especially Sofiane Tahrikt.

Biography

• Dr. Tazerart is a veterinarian with a magister degree in animal epidemiology. He is an instructor at Blida University and is a PhD student at Tiaret University, Algeria. His research interests include bovine and human tuberculosis in Algeria, with a focus on characterization of animal and human *M. bovis* strains.

Footnotes

Suggested citation for this article: Tazerart F, Saad J, Niar A, Sahraoui N, Drancourt M. *Mycobacterium bovis* pulmonary tuberculosis, Algeria. *Emerg Infect Dis.* 2021 Mar [*date cited*].

<https://doi.org/10.3201/eid2703.191823>

¹These authors equally contributed to this work.

References

1. Bouziane F, Allem R, Sebahia M, Kumanski S, Mougari F, Sougakoff W, et al.; CNR-MyRMA. First genetic characterisation of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Algeria. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;19:301–7. 10.1016/j.jgar.2019.05.010 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Djelouadji Z, Raoult D, Daffé M, Drancourt M. A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e253. 10.1371/journal.pntd.0000253 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:328–37. 10.1016/S1473-3099(07)70108-1 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Ifticene M, Kaïdi S, Khechiba MM, Yala D, Boulahbal F. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Algeria: Results of spoligotyping. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4:290–5. 10.1016/j.ijmyco.2015.06.004 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Ifticene M, Gacem FZ, Yala D, Boulahbal F. *Mycobacterium tuberculosis* genotype Beijing: About 15 strains and their part in MDR-TB outbreaks in Algeria. *Int J Mycobacteriol.* 2012;1:196–200. 10.1016/j.ijmyco.2012.10.006 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Forget N, Challoner K. Scrofula: emergency department presentation and characteristics. *Int J Emerg Med.* 2009;2:205–9. 10.1007/s12245-009-0117-8 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
7. de Beco O, Boulahbal F, Grosset J. [Incidence of the bovine bacillus in human tuberculosis at Algiers in 1969] [in French]. *Arch Inst Pasteur Alger.* 1970;48:93–101. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

8. Gharnaout M, Bencharif N, Abdelaziz R, Douagui H. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis*: about two cases [in French]. *Rev Mal Respir*. 2009;26:141 <https://www.em-consulte.com/rmr/article/197004>. [[Google Scholar](#)]
9. Michel AL, Müller B, van Helden PD. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet Microbiol*. 2010;140:371–81. 10.1016/j.vetmic.2009.08.029 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Saad J, Baron S, Lagier JC, Drancourt M, Gautret P. *Mycobacterium bovis* pulmonary tuberculosis after ritual sheep sacrifice in Tunisia. *Emerg Infect Dis*. 2020;26:1605–7. 10.3201/eid2607.191597 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

Articles from Emerging Infectious Diseases are provided here courtesy of **Centers for Disease Control and Prevention**

Article

Whole Genome Sequence Analysis of *Mycobacterium bovis* Cattle Isolates, Algeria

Fatah Tazerart ^{1,2,3}, Jamal Saad ^{3,4}, Naima Sahraoui ², Djamel Yala ⁵, Abdellatif Niar ⁶ and Michel Drancourt ^{3,4,*}

¹ Laboratoire d'Agro Biotechnologie et de Nutrition des Zones Semi Arides, Université Ibn Khaldoun, Tiaret 14000, Algeria; fatah_tazart@hotmail.com

² Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, Blida 09000, Algeria; nasahraoui@gmail.com

³ Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, 13005 Marseille, France; jsaad270@gmail.com

⁴ Faculté de Médecine, Aix-Marseille-Université, IHU Méditerranée Infection, 13005 Marseille, France

⁵ Laboratoire National de Référence pour la Tuberculose et Mycobactéries, Institut Pasteur d'Algérie, Alger 16015, Algeria; djamyala@yahoo.fr

⁶ Laboratoire de Reproduction des Animaux de la Ferme, Université Ibn Khaldoun, Tiaret 14000, Algeria; ameurh65@gmail.com

* Correspondence: michel.drancourt@univ-amu.fr

Abstract: *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), a *Mycobacterium tuberculosis* complex species responsible for tuberculosis in cattle and zoonotic tuberculosis in humans, is present in Algeria. In Algeria however, the *M. bovis* population structure is unknown, limiting understanding of the sources and transmission of bovine tuberculosis. In this study, we identified the whole genome sequence (WGS) of 13 *M. bovis* strains isolated from animals exhibiting lesions compatible with tuberculosis, which were slaughtered and inspected in five slaughterhouses in Algeria. We found that six isolates were grouped together with reference clinical strains of *M. bovis* genotype-Unknown2. One isolate was related to *M. bovis* genotype-Unknown7, one isolate was related to *M. bovis* genotype-Unknown4, three isolates belonged to *M. bovis* genotype-Europe 2 and there was one new clone for two *M. bovis* isolates. Two isolates from Blida exhibited no pairwise differences in single nucleotide polymorphisms. None of these 13 isolates were closely related to four zoonotic *M. bovis* isolates previously characterized in Algeria. In Algeria, the epidemiology of bovine tuberculosis in cattle is partly driven by cross border movements of animals and animal products.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; tuberculosis; cattle; Algeria



Citation: Tazerart, F.; Saad, J.; Sahraoui, N.; Yala, D.; Niar, A.; Drancourt, M. Whole Genome Sequence Analysis of *Mycobacterium bovis* Cattle Isolates, Algeria. *Pathogens* **2021**, *10*, 802. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070802>

Academic Editors: Andrew Byrnes and Lawrence S. Young

Received: 20 April 2021

Accepted: 18 June 2021

Published: 24 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bovine tuberculosis is a chronic, deadly infection most often caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) and *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*), two species belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex [1,2]. *M. bovis* most often infects cattle but also causes tuberculosis in other animal species and is a re-emerging cause of zoonotic tuberculosis in humans [3,4]. This disease poses a major threat to public health and creates socio-economic problems, including loss of meat due to seizures in slaughterhouses and lower milk yields [5,6]. Accordingly, bovine tuberculosis has an impact upon the international trade of animals and animal products [6,7], and bovine tuberculosis must be notified to the World Organization for Animal Health, as mentioned in its Terrestrial Animal Health Code [8].

In Algeria, some of the 2,049,652 heads of cattle [9] in the country are suspected to be infected by *M. bovis* [10]. Cases of bovine tuberculosis are often reported in slaughterhouse registers, and slaughterhouse workers exhibit a higher prevalence of *M. bovis* tuberculosis than the general population [11] (F. Tazerart, unpublished data). In Algeria, ante-mortem tuberculin skin test screening and post-mortem examinations for suspicious lesions at the slaughterhouse are the official diagnostic procedures for the disease [12]. Nevertheless,

in the absence of systematic laboratory diagnosis, definitive confirmation of the disease is lacking. Consequently, bovine tuberculosis remains a neglected infectious disease in Algeria, and few microbiology studies have been reported [10]. The identification of the circulation of *M. bovis* strains and their hosts and geographical distribution are poorly understood.

This study aimed to start bridging this gap, using whole genome sequencing (WGS) to investigate a few *M. bovis* strains currently circulating in Algeria.

2. Results

2.1. Data Analysis

Of the 928 cattle routinely slaughtered and inspected, 94 (10.13%, CI 8.24–12.34%) animals had visible lesions compatible with tuberculosis. The prevalence of suspected lesions significantly varied across the five studied slaughterhouses ($p = 0.001$). Prevalence was 20.9% at the Médéa slaughterhouse, which was the most affected site, and 5.8% at the Bgayet slaughterhouse, which was the least affected site (Figure 1). Males accounted for 617/928 (66.5%) of slaughtered animals and females for 311/928 (33.5%) ($p < 10^{-4}$), although the prevalence of tuberculous lesions was higher in females than in males ($n = 41/311$ (13.18%) compared to $n = 53/617$ (8.59%), $p = 0.038$). Most of the slaughtered animals were aged <2 years ($n = 427/928$; 46%), followed by animals aged 2–5 years ($n = 399/928$; 43%) and animals older than 5 years ($n = 102/928$; 11%). Older animals >5 years were most affected (25.5%), followed by young animals (<2 years) at 9.83%, then adult animals (2–5 years) at 6.51%. The differences among prevalence values were significant ($p < 10^{-4}$). Most slaughtered animals were of average weight (score 2.5–3) (536/928; 57.75%), followed by lean animals (286/928; 30.81%). The prevalence of the suspected lesions was 60/536 (11.2%) in average weight animals, 31/286 (10.8%) in lean animals and 03/106 (2.8%) in fatty animals ($p = 0.03$). Tuberculous lesions were mainly located on the lymph nodes (95.7%) and 4.3% in the viscera (Table 1).

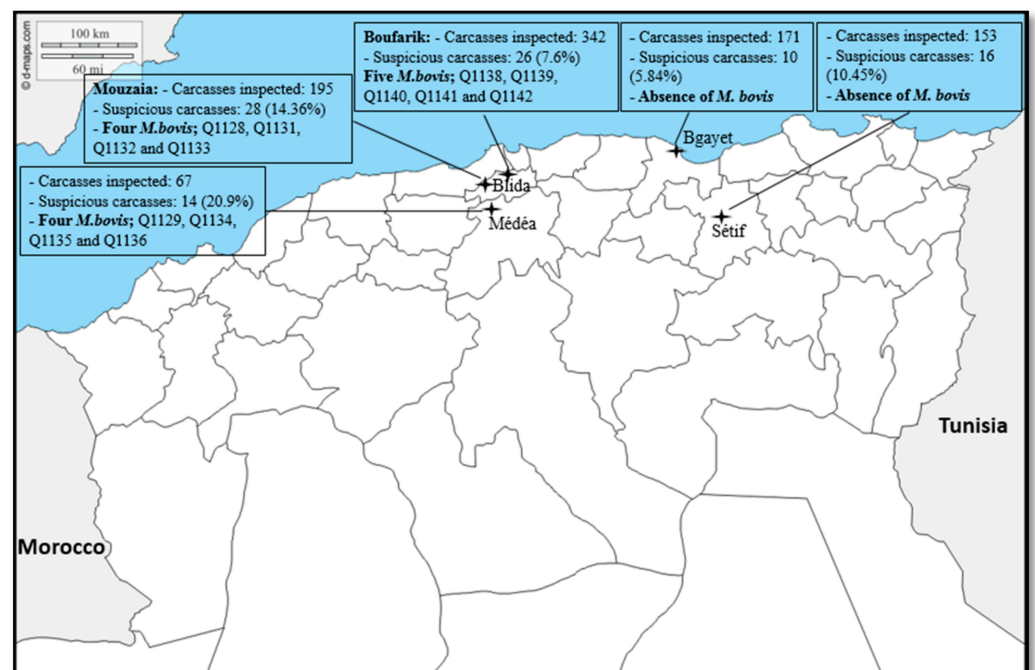


Figure 1. Location of the five slaughterhouses in four departments in northern Algeria.

Table 1. Distribution of suspected cases of tuberculosis according to the variation factors.

Variation Factors		Number of Suspect Carcasses	Rate (%)	Total	<i>p</i>
Gender	Male	53	8.59	617	0.038
	Female	41	13.18	311	
Age	Young (<2 years)	42	9.83	427	<10 ^{−4}
	Adults (2–5 years)	26	6.51	399	
	Elderly (>5 years)	26	25.5	102	
Weight (score)	Lean (1–2)	31	10.83	286	0.03
	Middle (2.5–3)	60	11.19	536	
	Fat (3.5–5)	3	2.83	106	
Location	Lymph nodes	90	95.74	-	-
	Viscera	4 (3 lungs, 1 liver)	4.26	-	
Total		94	10.13	928	

2.2. Genomic Typing Analysis

A total of 94 samples, including 90 lymph node samples, three lung samples and one liver sample, yielding 13 cultures obtained on Löwenstein–Jensen culture medium, Middlebrook 7H10 solid medium and Coletsos medium were identified as *M. tuberculosis* complex by partial *rpoB* PCR-sequencing. No other mycobacterial species was cultured from these samples. Further WGS refined the identification of the 13 isolates as *M. bovis*. Previously, the work of Loiseau et al. indicated that the diversity of *M. bovis* in Africa has been underestimated, after their discovery of new clonal complexes in the continent [13]. Genomic comparison of the Algerian *M. bovis* isolates to the ones reviewed in the work of Loiseau et al. indicated four different clonal complexes of *M. bovis* in Algeria—three of which were the newly discovered ones, and one of which was known—the Eu2 clonal complex commonly found in western Europe. Specifically, we found six isolates, namely Q1128, Q1131, Q1135, Q1138, Q1139 and Q1142, which were grouped together with reference clinical strains of *M. bovis* clonal complex-Unknown2. One isolate, Q1134, was related to *M. bovis* clonal complex-Unknown7; one isolate, Q1140, was related to *M. bovis* clonal complex-Unknown4; three isolates, Q1141, Q1129 and Q1136, belonged to *M. bovis* clonal complex-Europe 2; and there was one new clone for two isolates, Q1132 and Q1133, which did not belong to any of the clonal complexes identified by Loiseau et al. (Figure 2, Table S1) [13]. Based on available data for 3364 clinical isolates of *M. bovis* (Tables S1 and S3) [13], African countries other than Algeria included Ethiopia, Malawi, Eritrea, Morocco, Tunisia and South Africa. European countries included the UK, Switzerland, Sweden, Spain, France, Italy, Germany, Netherlands and Belgium. American countries included the USA, Canada, Brazil and Mexico. Asian countries include Lebanon. The proportions of *M. bovis* genotypes observed in Algeria were significantly different than those observed in other countries ($p < 0.001$), other African countries ($p = 0.045$) and American countries ($p < 0.001$) but did not significantly differ from European countries ($p = 0.245$). Using a 12 SNPs cut-off to detect potential cross-transmission [14], we detected one group of transmission involving isolates Q1132 and Q1133 exhibiting 215-SNPs, and 0-SNPs after removing repetitive regions (Figure 2, Table S2).

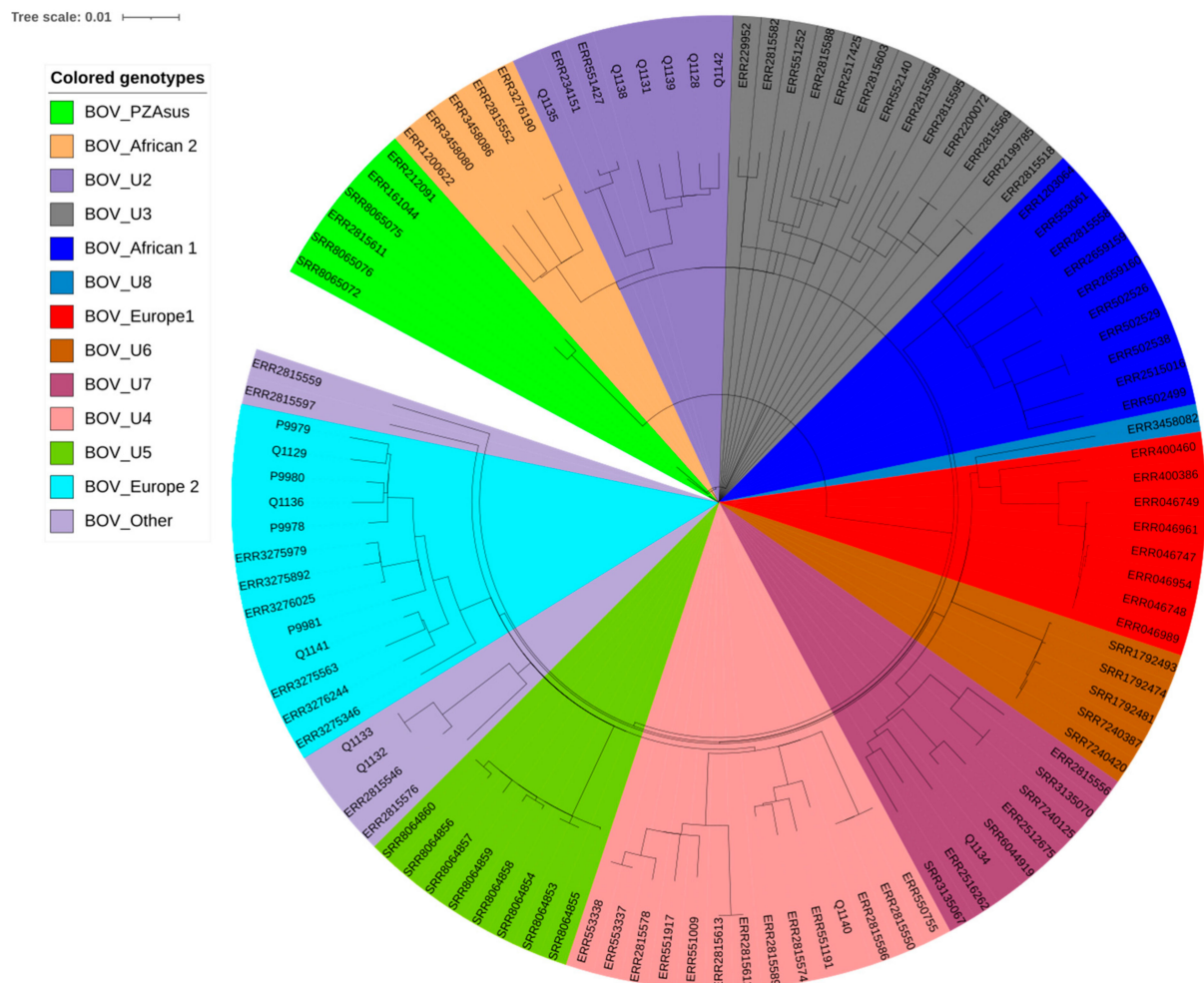


Figure 2. Phylogeny tree of 105 genome sequence of *Mycobacterium bovis* based on 2881 variable positions extracted using MTBseq. The scale bar indicates the number of substitutions per polymorphic site. The tree was generated using PhyML 3.0 online tools.

Further comparison of bovine isolates with four available Algerian patients' *M. bovis* isolates previously determined as belonging to the European 2 group (P9978, P9979, P9980 and P9981) [15] indicated no evidence of zoonotic infection of these isolates alone using the same SNP cut-off as above (12-SNPs). Statistical information on the genome sequences are reported in Supplementary Data Table S1. Reads were deposited in GenBank with accession number PRJNA715078.

3. Discussion

In Algerian slaughterhouses, the inspection of slaughtered animals to look for lesions compatible with tuberculosis differs from one slaughterhouse to another.

Here, more males than females were slaughtered, in accordance with regulations prohibiting the slaughter of female animals other than in cases of necessity. However, we observed a significantly higher prevalence of tuberculosis in females than in males, an observation that may also reflect an increased susceptibility of females that go through gestation, parturition and lactation, and live a long, productive life [16]. Most slaughtered animals were under two years old, reflecting the high organoleptic value of meat in young animals, which is in great demand. However, older animals over the age of five years had a significantly higher prevalence of lesions suspected of being tuberculosis. Indeed, the chances of exposure to tuberculosis increases with age [17]. Most slaughtered animals were of average weight (score 2.5–3) reflecting consumer preference for meat containing a

reasonable amount of fat. In addition, we observed a significant difference between the three body weight scores of animals suspected of tuberculosis; those of average weight were most affected, followed by those that were lean, then fatty animals, potentially explained by the wasting nature of this disease [18].

In this context, this report on the WGS-based identification and typing of a collection of *M. bovis* isolates updates the 2007 snapshot of bovine tuberculosis in Algeria [10]. The prevalence of bovine tuberculosis, as estimated from the veterinary inspection of slaughtered cattle, was 10.13%, higher than previously reported in Algeria in 2007 (3.6%) and in neighboring Morocco in 2014–2015 (3.7%) [10,19].

In this study, WGS revealed the presence of four different genotypes of *M. bovis* and one new genotype in Algeria compared to 12 genotypes reported by Loiseau et al. (Figure 2, Table S1) [13]. We detected two isolates exhibiting a closely related WGS pattern, suggesting these two isolates, Q1132 and Q1133, were issued from the same *M. bovis* clone. These two isolates were isolated from the same slaughterhouse (Mouzaia in Blida).

Unsurprisingly, these data illustrate the cross-border spread of *M. bovis* and the fact that Algeria regularly imports live cattle from Europe, notably from France and Spain, each supplying 40,000 heads of cattle per year [20,21]. These data indicate that part of the epidemiology of bovine tuberculosis in cattle in Algeria is driven by the cross-border movement of animals.

However, limited information about slaughtered animals, such as their origin and movements, limits the possibility of carrying out a spatial epidemiological study on the distribution of bovine tuberculosis. Illegal slaughter further complicates the establishment of such a bovine tuberculosis map. Additionally, only 13 *M. bovis* isolates were available for this first ever WGS analysis of animal *M. bovis* in Algeria. Such a small sample is likely to underestimate pathogen diversity in Algeria and is therefore unlikely to ascertain epidemiological linkages between cases.

Finally, despite the above-reported limitations, this founding WGS-based study in Algeria indicates the contribution of WGS to tracing animal *M. bovis* isolates in that country. This study suggests that it would be of interest to establish an Algerian national *M. bovis* WGS database for tracing sources of infection, including the potential role of cross-border importation and of wild fauna, as reported in other countries such as the UK [22,23], and the cross-transmission in farms. Further comparisons between human [15] and animal isolates would also help to trace sources of zoonotic *M. bovis* tuberculosis in patients from a medical prevention perspective.

Given such a small number of isolates, this analysis could be very skewed, and a larger number of studied isolates may provide similarities with other locations. This indicates that continued research in this area is required.

Despite this limitation, we did find similarities with European nations, which is consistent with cattle being imported into Algeria from Europe and the historical links between these regions

4. Materials and Methods

4.1. Study Area and Sample Collection

The study was conducted during different periods of 2017 and 2018 in five slaughterhouses in Algeria, namely the slaughterhouses in Bgayet (January–May 2018), Sétif (January–May 2018), Médéa (December 2016–April 2017), Mouzaia (March–May 2017) and the slaughterhouses in Boufarik, which are in the department of Blida (Figure 1) (March–May 2018). The distance between each slaughterhouse was estimated to be between 27 km (Mouzaia–Boufarik) and 315 km (Sétif–Mouzaia). In detail, these 13 isolates were obtained from three slaughterhouses, namely the Mouzaia slaughterhouse in Blida (Q1128, Q1129, Q1131, Q1132 and Q1133), the Médéa slaughterhouse (Q1134, Q1135 and Q1136) and the Boufarik slaughterhouse in Blida (Q1138, Q1139, Q1140, Q1141 and Q1142). The choice of these slaughterhouses was justified by their accessibility and their relative size in the region in terms of cattle slaughter. Cattle slaughtered in these slaughterhouses came from

the neighboring regions or sometimes from remote regions. An information sheet was systematically established for each animal slaughtered, including sex, age, breed, body score and origin. During the study period, lesions of suspected tuberculosis were collected from slaughtered cattle and conserved for 11–15 months at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further processing.

4.2. Tissue Preparation and Culture

Some of these samples were processed at the Institut Pasteur d'Algérie in Algiers, and the rest were processed in the biosafety level 3 laboratory (BSL3) at the Institut Hospitalier Universitaire, Méditerranée Infection in Marseille. At the Institut Pasteur d'Algérie, gross visible lesions were thawed, dissected and crushed using a sterile pestle and mortar. Crushed tissues were decontaminated by adding 4 mL of 4% NaOH [24] and washed with sterile distilled water. Pellets were inoculated in a Löwenstein–Jensen culture medium containing glycerol (three tubes) and were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 weeks. At the Institut Hospitalier Universitaire, gross visible lesions were thawed, and aliquots were decontaminated into a triple volume of 1% chlorhexidine (chlorhexidine digluconate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [25] incubated for 30 min at room temperature with manual agitation every five minutes. After eliminating chlorhexidine, 10 mL of a neutralizing solution (1000 mL sterile phosphate buffered saline (PBS), 3 g egg lecithin and 10 mL Tween 80) were added, and the mixture was left at room temperature for 10 min with agitation to inactivate the remaining chlorhexidine. After three sterile PBS washes, the decontaminated tissue was finely crushed using Potter's crusher and inoculated in four types of culture media including Middlebrook 7H10 solid medium containing 10% (*v/v*) oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC) (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) and 0.5% (*v/v*) glycerol (Euromedex, Souffelweyersheim, France); 10% OADC-Middlebrook 7H10 solid medium containing sodium pyruvate (4.16 mg/mL) (Sigma-Aldrich) [26,27]; 10% OADC-Middlebrook 7H9 liquid medium (Becton Dickinson), containing 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich) [28]; and Coletsos medium (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Cultures were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 weeks with a 10-day follow-up of colony growth.

4.3. Isolate Identification

Any culture growing on any of the solid media was dissolved in 200 μL PBS and inactivated at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for one hour before further handling in the biosafety level 2 (BSL2) laboratory. Total DNA was extracted by vortexing the suspension with glass powder (Sigma-Aldrich) using the FastPrep apparatus (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) and extracting DNA using a Qiagen kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), as previously described [29]. Partial *rpoB* gene PCR-sequencing was then performed to confirm the *M. tuberculosis* complex, as previously described [30].

4.4. Genome Sequence Analyses

As for whole genome sequence (WGS) experiments, DNA was extracted using the InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and quantified using a Qubit assay with the high sensitivity kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). A total of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of DNA was then sequenced by Illumina MiSeq runs (Illumina Inc., San Diego, USA). DNA was fragmented and amplified by limited PCR (12 cycles), introducing dual-index barcodes and sequencing adapters. After purification on AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA), the libraries were normalized and pooled for sequencing on the MiSeq. Paired-end sequencing and automated cluster generation with dual indexed 2×250 -bp reads were performed. Output sequencing reads were analyzed using MTBseq [31] to identify species, lineages and sub-lineages and to calculate the SNP distance between study strains. MTBseq was used also to extract and align the SNPs between the genome studies. Identification results were supported by other tools such as TB Profiler and Mykrobe Predictor-TB [32,33]. A phylogenetic tree based on extracted SNPs between 105 *M. bovis* genomes was generated using PhyML 3.0 online tools (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=phyml; accessed on 1 October 2020).

4.5. Statistical Analysis

The data collected were analyzed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 23.0) and Microsoft Office Excel software programs. As a criterion, reliability difference indicators used the profile $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using Chi-square tests to compare the presence of risk factors between suspected cases of tuberculosis (Table 1) and to compare the proportions of *M. bovis* genotypes, among other genotypes in different geographic regions/countries. We delineated four groups of data: Group 1, all countries in the 3364-isolates database; Group 2, all African countries from the database; Group 3, all American countries; and Group 4, all European countries.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10070802/s1>, Table S1: Statistical genomes data of study strains extracted using MTBseq. Table S2: SNPs distance between study strains using MTBseq. Table S3: Published data of several *M. bovis* genotypes detected in Algeria.

Author Contributions: F.T., J.S. and M.D. conceived and designed the experiments, conceived the methodology and wrote the manuscript. F.T. carried out the investigations, performed the experiments and the laboratory manipulations. J.S. carried out genome characterization and bioinformatic analysis. F.T. and J.S. carried out the formal analysis and processed the data on software. D.Y. and M.D. set up the material resources. N.S., A.N. and M.D. supervised the project. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research under the Exceptional National Programme (P.N.E.) and by the University of Blida 1. This study was also supported by the French Government under the Investissements d’Avenir (Investments for the Future) programme managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, fr: National Agency for Research) (reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03).

Institutional Review Board Statement: According to Algerian law, no Ethics Committee approval is required when analyzing tissues collected post-mortem after an animal has been slaughtered in an official slaughterhouse.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank staff and veterinarians of the five slaughterhouses in Algeria for their support and help with our work. The authors acknowledge the help of Zolikha Ali Mahine, Wahiba Akkouche, Yanis Dissi, Amir Affoune, Fatima Aissaoui, Kenza Medini and Abderrahmane Benkouar for their participation and collection of samples. We would also like to offer our thanks to Sofiane Tahrikt for his help in preparing and sending samples from Blida to IHU in Marseille.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Boukary, A.R.; Thys, E.; Rigouts, L.; Matthys, F.; Berkvens, D.; Mahamadou, I.; Yenikoye, A.; Saegerman, C. Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in Niger. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *59*, 490–502. [[CrossRef](#)]
2. Lorente-Leal, V.; Liandris, E.; Castellanos, E.; Bezos, J.; Domínguez, L.; de Juan, L.; Romero, B. Validation of a Real-Time PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members in Bovine Tissue Samples. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Eroksuz, Y.; Baydar, E.; Otlu, B.; Dabak, M.; Eroksuz, H.; Karabulut, B.; Incili, C.A.; Timurkan, M.O. Case report: Systemic tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in a cat. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Nebreda-Mayoral, T.; Brezmes-Valdivieso, M.F.; Gutiérrez-Zufiaurre, N.; García-de Cruz, S.; Labayru-Echeverría, C.; López-Medrano, R.; López-Urrutia-Lorente, L.; Tinajas-Puertas, A.; Rivero-Lezcano, O. Human *Mycobacterium bovis* infection in Castile and León (Spain), 2006–2015. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl. Ed.)* **2019**, *37*, 19–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Belkhiri, M.; Tlidjane, M.; Benhathat, Y.; Meziane, T. Histopathological study and pulmonary classification of bovine lesions. *Afr. J. Agric. Res.* **2009**, *4*, 584–591.
6. Boland, F.; Kelly, G.E.; Good, M.; More, S.J. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Prev. Vet. Med.* **2010**, *93*, 153–161. [[CrossRef](#)]

7. Cousins, D.V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2001**, *20*, 71–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. World Organisation for Animal Health. Bovine Tuberculosis. 2020. Available online: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/bovine-tuberculosis/#A> (accessed on 19 February 2020).
9. Ministry of Agriculture and Rural Development and Fishing of Algeria. Department of Veterinary Services. Establishment of an Animal Identification, Registration and Monitoring System in Algeria. K. Boughalem CVO Algeria Algiers, Algeria—November 24 and 25, 2015. *CPC/REMESA*. Available online: https://docplayer.fr/43882308-Dr-k-boughalem-cvo-algerie-alger-algerie-24-et-25-novembre-2015-cpc-remesa.html?fbclid=IwAR37DQnECLLe-WWs85AseZi5iXI31I8cFkFxFUNKMBA5o19_FJdprpa-uPog (accessed on 19 February 2020).
10. Sahraoui, N.; Müller, B.; Guetarni, D.; Boulahbal, F.; Yala, D.; Ouzrout, R.; Berg, S.; Smith, N.H.; Zinsstag, J. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Vet. Res.* **2009**, *5*, 4. [[CrossRef](#)]
11. Michel, A.L.; Müller, B.; van Helden, P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 371–381. [[CrossRef](#)]
12. Sahraoui, N.; Muller, B.; Mamache, B.; Yala, D.; Boulahbal, F.; Zinsstag, J.; Guetarni, D. Tuberculosis in cattle and Goat of North Algeria. *Vet. Res.* **2011**, *4*, 100–103.
13. Loiseau, C.; Menardo, F.; Aseffa, A.; Hailu, E.; Gumi, B.; Ameni, G.; Berg, S.; Rigouts, L.; Robbe-Austerman, S.; Zinsstag, J.; et al. An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evol. Med. Public Health* **2020**, *2020*, 49–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yang, C.; Luo, T.; Shen, X.; Wu, J.; Gan, M.; Xu, P.; Wu, Z.; Lin, S.; Tian, J.; Liu, Q.; et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China: A retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 275–284. [[CrossRef](#)]
15. Tazerart, F.; Saad, J.; Niar, A.; Sahraoui, N.; Drancourt, M. *Mycobacterium bovis* Pulmonary Tuberculosis, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 972. [[CrossRef](#)]
16. Teklu, A.; Asseged, B.; Yimer, E.; Gebeyehu, M.; Woldesenbet, Z. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: The experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. *Rev. Sci. Tech.* **2004**, *23*, 957–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gebrezgabihier, G.; Romha, G.; Ameni, G. Prevalence study of bovine tuberculosis and genus typing of its causative agents in cattle slaughtered at Dilla Municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Afr. J. Basic Appl. Sci.* **2014**, *6*, 103–109.
18. Terefe, D. Gross pathological lesions of bovine tuberculosis and efficiency of meat inspection procedure to detect-infected cattle in Adama municipal abattoir. *J. Vet. Med. Anim. Health* **2014**, *6*, 48–53.
19. Yahyaoui-Azami, H.; Aboukhashib, H.; Bouslikhane, M.; Berrada, J.; Rami, S.; Reinhard, M.; Gagneux, S.; Feldmann, J.; Borrell, S.; Zinsstag, J. Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 272. [[CrossRef](#)]
20. Chougar, L.; Amor, N.; Farjallah, S.; Harhoura, K.; Aissi, M.; Alagaili, A.N.; Merella, P. New insight into genetic variation and haplotype diversity of *Fasciola hepatica* from Algeria. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 1179–1192. [[CrossRef](#)]
21. Ministry of Agriculture, Food and Environment of Spain. Livestock Foreign Trade: MAPAMA’s Role. Conference on the Export of Live Cattle to Third Countries. 2017. Available online: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/comercio-exterior-ganadero/01comercioexteriorganaderopapeldelmapama_tcm30-426534.pdf (accessed on 25 March 2020).
22. Pavlik, I.; Machackova, M.; Yayo Ayele, W.; Lamka, J.; Parmova, I.; Melicharek, I.; Hanzlikova, M.; Körmendy, B.; Nagy, G.; Cvetnic, Z.; et al. Incidence of bovine tuberculosis in wild and domestic animals other than cattle in six Central European countries during 1990–1999. *Vet. Med. Praha* **2002**, *47*, 122–131. [[CrossRef](#)]
23. Krajewska-Wędzina, M.; Didkowska, A.; Sridhara, A.A.; Elahi, R.; Johnathan-Lee, A.; Radulski, Ł.; Lipiec, M.; Anusz, K.; Lyashchenko, K.P.; Miller, M.A.; et al. Transboundary tuberculosis: Importation of alpacas infected with *Mycobacterium bovis* from the United Kingdom to Poland and potential for serodiagnostic assays in detecting tuberculin skin test false-negative animals. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 1306–1314. [[CrossRef](#)]
24. Petroff, S.A. Some cultural studies on the tubercle bacillus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **1915**, *26*, 276–279.
25. Asmar, S.; Drancourt, M. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 155. [[CrossRef](#)]
26. Chambers, M.A.; Williams, A.; Gavier-Widén, D.; Whelan, A.; Hall, G.; Marsh, P.D.; Bloom, B.R.; Jacobs, W.R.; Hewinson, G. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG Auxotrophic Mutant That Protects Guinea Pigs against *M. bovis* and Hematogenous Spread of *Mycobacterium tuberculosis* without Sensitization to Tuberculin. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 7094–7099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dean, G.S.; Clifford, D.; Whelan, A.O.; Tchilian, E.Z.; Beverley, P.C.; Salguero, F.J.; Xing, Z.; Vordermeier, H.M.; Villarreal-Ramos, B. Protection induced by simultaneous subcutaneous and endobronchial vaccination with BCG/BCG and BCG/adenovirus expressing antigen 85A against *Mycobacterium bovis* in cattle. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142270.
28. García-Barragán, Á.; Gutiérrez-Pabello, J.A.; Alfonso-Silva, E. Calcitriol increases nitric oxide production and modulates microbicidal capacity against *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *59*, 17–23. [[CrossRef](#)]
29. Angelakis, E.; Roux, V.; Raoult, D.; Rolain, J.-M. Real-time PCR strategy and detection of bacterial agents of lymphadenitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *28*, 1363–1368. [[CrossRef](#)]

30. Adékambi, T.; Colson, P.; Drancourt, M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5699–5708. [[CrossRef](#)]
31. Kohl, T.A.; Utpatel, C.; Schleusener, V.; Filippo, M.R.D.; Beckert, P.; Cirillo, D.M.; Niemann, S. MTBseq: A comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ* **2018**, *6*, e5895. [[CrossRef](#)]
32. Coll, F.; McNerney, R.; Preston, M.D.; Guerra-Assunção, J.A.; Warry, A.; Hill-Cawthorne, G.; Mallard, K.; Nair, M.; Miranda, A.; Alves, A.; et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* **2015**, *7*, 51. [[CrossRef](#)]
33. Hunt, M.; Bradley, P.; Lapierre, S.G.; Heys, S.; Thomsit, M.; Hall, M.B.; Malone, K.M.; Wintringer, P.; Walker, T.M.; Cirillo, D.M.; et al. Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with Mykrobe. *Wellcome Open Res.* **2019**, *4*, 191. [[CrossRef](#)]

Description of a Clinical Strain of *Mycobacterium cambodiensis* sp. nov., a New Member of the *Mycobacterium simiae* Complex

Fatah Tazerart^{1,2,3}, Jamal Saad^{1,4}, Muriel Militello^{1,4}, Sophie Alexandra Baron^{1,4}, Michel Drancourt^{1,4*}, Sylvain Godreuil⁵

¹Department of IHU Méditerranée Infection, Marseille, France; ²Department of Laboratoire d'Agro Biotechnologie et de Nutrition des Zones Semi Arides, Université de Tiaret, Tiaret, Algeria; ³Institut des Sciences Vétérinaires- Université de Blida 1, Blida, Algeria; ⁴Aix-Marseille Univ, Marseille, France; ⁵Laboratoire de Bactériologie, CHU Montpellier, MIVEGEC, IRD, CNRS, Université de Montpellier, France

ABSTRACT

A bronchoalveolar lavage sample was collected by bronchoscopy from a 25-year-old Cambodian male patient with suspected clinical tuberculosis and was inoculated in Löwenstein-Jensen medium. Colonies of a rapidly growing, non-chromogenic Gram-positive and acid-fast bacterium were investigated. Scanning electron microscopy showed $1.2 \pm 0.29 \mu\text{m}$ -long and $0.58 \pm 0.07 \mu\text{m}$ -large bacilli that could not be identified using routine matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry and phenotypic tests (API[®] ZYM, API[®] Coryne and Biolog[®] Phenotype MicroArray assays). In vitro, the isolate was susceptible to isoniazid, amikacin and trimethoprim-sulfamethoxazole. Whole-genome sequencing yielded a 5,703,981-bp draft genome that displayed 69.3% of GC content with 5,207 coding-protein genes and 56 predicted RNA genes, including 3 rRNAs. The *rpoB* sequence showed 93% sequence similarity with that of *Mycobacterium parascrofulaceum* in the *Mycobacterium simiae* complex. Genome sequence-derived DNA-DNA hybridization, OrthoANI and pan-genomic analyses confirmed that this isolate represented an undescribed species within the *M. simiae* complex. This species was named *Mycobacterium cambodiensis* after its source of isolation. The isolate was deposited in the Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR) with the number CSURP9652.

Keywords: Non-tuberculosis mycobacterium; *Mycobacterium simiae* complex; *Mycobacterium cambodiensis*

INTRODUCTION

In Cambodia, a country with high tuberculosis burden (incidence, for all clinical forms, estimated at 326 per 100,000 inhabitants in 2017, with 47,000 new cases reported for 16 million inhabitants [1-3]), infections caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM) also have been recorded. In 2011, the rate of NTM isolation among patients with presumptive multidrug-resistant tuberculosis and positive culture was 26.1% [4]. Among 128 (10.8%) NTM infections diagnosed in patients at Kampong Cham Provincial Reference Hospital between 2012 and 2014, the NTM species could not be identified in 22 cases. Moreover, four patients were co-infected by a NTM and a *Mycobacterium tuberculosis* complex species [5].

Here, we present the analysis of one isolate, initially referred as

strain 716A, from a sputum specimen collected in a Cambodian patient with suspected clinical tuberculosis. We accumulated phenotypically and genetic evidences showing that this isolate belongs to a new species within the *Mycobacterium simiae* complex. We report the complete polyphasic characterization of strain 716A and its specific features relative to the other known species within the *M. simiae* complex.

MATERIALS AND METHODS

Phenotypic characterization

Strain 716A was cultured on Middlebrook 7H10 agar medium (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) supplemented with 10% OADC (Becton Dickinson) and in the mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) liquid medium (BACTEC[™] MGIT[™]

Correspondence to: Michel Drancourt, Department of IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille-Univ., IRD, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, 19-21 bd Jean Moulin Marseille, France, Tel: +33 (0) 4 13 73 23 01; E-mail: michel.drancourt@univ-amu.fr

Received: August 10, 2021; **Accepted:** August 24, 2021; **Published:** August 31, 2021

Citation: Tazerart F, Saad J, Militello M, Baron SA, Drancourt M, Godreuil S, et al. (2021) Description of a Clinical Strain of *Mycobacterium cambodiensis* sp. nov., a New Member of the *Mycobacterium simiae* Complex. Appl Microbiol Open Access. 7: 211.

Copyright: © 2021 Tazerart F, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

960, Becton Dickinson). Enzyme activities and carbon source utilization were determined by inoculating API® ZYM and API® Coryne strips (bioMérieux, Bruz, France) [6], as described by the manufacturer, with an incubation time of four hours and 24 hours, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the major antimycobacterial agents was determined using the ETEST® (bioMérieux, Craponnes, France).

Biolog phenotype microarray

The capacity of strain 716A to resist or not to 23 inhibitory chemicals and to metabolize 71 different carbon substrates was evaluated using Gen III Microplates Biolog® Phenotype MicroArray (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) [7]. Strain 716A was cultured at 37°C on Middlebrook 7H10 agar medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), 10% (v/v) OADC (Becton Dickinson) and 0.5% (v/v) glycerol for two weeks. Colonies were gently taken with sterile swabs, suspended in IF-C2 tubes, and adjusted to 65% transmittance using a turbidimeter (Biolog Inc). Suspensions were then poured into a sterile reservoir and 100 µL of each suspension were deposited in a well of a 96-well plate (with positive and negative control). Two plates (duplicate) were used and incubated in the OmniLog PM System (Biolog Inc.) at 37°C for four days. Results were expressed as area under the curve (AUC) by the Biolog parametric software.

Scanning electron microscopy

The shape and size of strain 716A were determined by scanning electron microscopy (TM4000, Hitachi, Tokyo, Japan) after negative staining at an operating voltage of 15 kV.

MALDI-TOF-MS

The full extraction protocol recommended by Bruker (Bruker Daltonics®, Bremen, Germany) was followed, using glass powder (G8772, Sigma-ALD), pure acetonitrile and formic acid diluted to 70%, as previously described [8]. Then, 1 µL of supernatant was deposited on a ground-steel MALDI target plate. After drying at room temperature, 1 µL of matrix solution (saturated α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 25% trifluoroacetic acid and 25% H₂O) (Sigma-Aldrich) was deposited on the sample. After drying at room temperature, the plate was loaded for analysis in the Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics). The results were obtained in the form of spectra and scores; spectra were recorded according to the previously described parameters [9] and were obtained using the MALDI Biotyper (MBT) Compass software, version 4.1.80. The identifications and their scores were obtained with the MALDI Biotyper software, version 4.1.80, and the Mycobacteria Library, version 4.0, database (contains 880 MSPs) (June version, 2017).

DNA preparation and genome sequencing

Total DNA of strain 716A was extracted by vortexing the suspension with glass powder (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) using the FastPrep apparatus (MP Biomedicals, Santa Ana California, USA) and the Qiagen kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), as previously described [10]. Then DNA was quantified with the Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), and 0.2 µg/µL of DNA was sequenced with the Illumina MiSeq system (Illumina Inc., San Diego, USA). Paired-end sequencing and automated cluster generation with dual indexed 2× 250-bp reads were performed in a 40-hour run [11].

Genome characterization and genome comparisons

The genome was assembled with SPAdes, version 3.12.0[12], and annotated with Prokka, version 1.13[13]. Emboss GC% and BlastN against the NCBI database were used for detecting the presence of plasmids. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) was used to identify antibiotic resistance genes. The *rpoB* gene, TYGS (Type strain genome server) based on the 16S rRNA gene, and Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) was used to screen all species related to this strain. The similarity among genomes was estimated with the Genome to Genome Distance Calculator (GGDC), available at, and formula 2 was recommended to interpret the results of the analyzed draft genome. The mean levels of relatedness between strain 716A genome sequence and the sequences of other *M. simiae* complex members were measured with Orthologous Average Nucleotide Identity (OrthoANI). The DDH and OrthoANI values of this strain were calculated with all *M. simiae* complex members. The Roary pan-genome pipeline in the Galaxy software was used to release the pan-genomic comparison with other *Mycobacterium* species.

RESULTS

Strain 716A formed orange, smooth and scotochromogenic colonies on Middlebrook 7H10 agar medium, containing 10% (v/v) OADC and 0.5% (v/v) glycerol, after 12-day incubation at 37°C. Biochemical characterization of strain 716A showed a positive reaction to the catalase test, but the oxidase test was negative at room temperature. Investigation of the strain enzymatic activity, using the API ZYM and API CORYNE strips (bioMérieux, Craponne, France), gave positive results for esterase (C4), lipase esterase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, and alkaline phosphatase. These observations suggested that strain 716A was a Gram-positive bacterium, and Ziehl-Neelsen staining showed pink acid-fast bacilli. Scanning electron microscopy analysis of 100 bacilli indicated that these rod-shaped bacilli measured $1.2 \pm 0.29 \mu\text{m}$ in length and $0.58 \pm 0.07 \mu\text{m}$ in width (Figure 1). The reproducible matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) profile of strain 716A did not match any of the existing profiles in the Bruker database (version 4.1.80), with an identification score <1.38 (Figure 2). This suggested that strain 716A could be an undescribed species. Strain 716A was deposited in the Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR) with the number CSURP9652. Moreover, in vitro antibiotic susceptibility testing showed that strain 716A was susceptible to isoniazid (minimum inhibiting concentration, MIC=0.47 µg/mL), amikacin (MIC=1 µg/mL) and trimethoprim-sulfamethoxazole (MIC=0.19 µg/mL), and resistant to linezolid (MIC>256 µg/mL), minocycline (MIC>256 µg/mL), doxycycline (MIC>256 µg/mL), rifampicin (MIC>256 µg/mL) and chloramphenicol (MIC>256 µg/mL). Additional phenotypic analyses with the Biolog® Phenotype MicroArray technology (Hayward, California, United States of America) indicated that strain 716A metabolized four carbon sources: Tween 40 (from 24 hours to 7 days), methyl pyruvate and citric acid (from 50 hours to 7 days) and glycerol (only from 90 hours to 7 days). Conversely, strain 716A was not altered by tetrazolium violet during the entire incubation period (from 10 hours to 7 days) (Table 1).

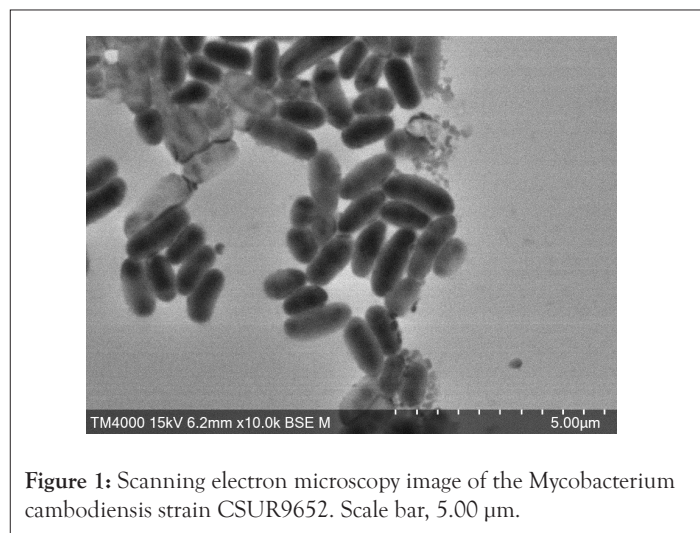


Figure 1: Scanning electron microscopy image of the *Mycobacterium camboediensis* strain CSUR9652. Scale bar, 5.00 μm.

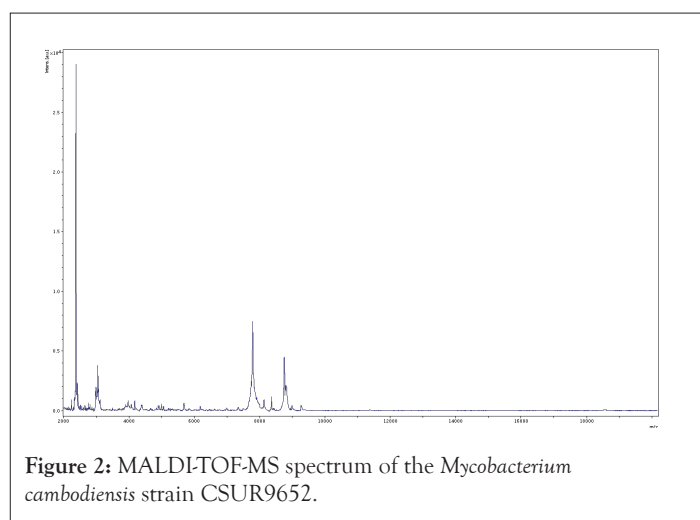


Figure 2: MALDI-TOF-MS spectrum of the *Mycobacterium camboediensis* strain CSUR9652.

Table 1: Scanning electron microscopy image of the *Mycobacterium camboediensis* strain CSUR9652. Scale bar, 5.00 μm.

Position	Substrate	Activity
D 5	Glycerol	+
F 11	Tetrazolium Violet	+
G 2	Methyl Pyruvate	+
G 5	Citric Acid	+
H 1	Tween 40	+
A 1	Negative Control	-
A 2	Dextrin	-
A 3	D-Maltose	-
A 4	D-Trehalose	-
A 5	D-Cellulobiose	-
A 6	Gentiobiose	-
A 7	Sucrose	-
A 8	D-Turanose	-
A 9	Stachyose	-
A 10	Positive Control	-
A 11	pH 6	-
A 12	pH 5	-
B 1	D-Raffinose	-
B 2	alpha-D-Lactose	-
B 3	D-Melibiose	-
B 4	beta-Methyl-D-glucoside	-
B 5	D-Salicin	-
B 6	N-Acetyl-D-glucosamine	-
B 7	N-Acetyl-beta-D-mannosamine	-
B 8	N-Acetyl-D-galactosamine	-
B 9	N-Acetyl Neuraminic Acid	-

B 10	1% NaCl	-
B 11	4% NaCl	-
B 12	8% NaCl	-
C 1	a-D-Glucose	-
C 2	D-Mannose	-
C 3	D-Fructose	-
C 4	D-Galactose	-
C 5	3-Methyl Glucose	-
C 6	D-Fucose	-
C 7	L-Fucose	-
C 8	L-Rhamnose	-
C 9	Inosine	-
C 10	1% Sodium Lactate	-
C 11	Fusidic Acid	-
C 12	D-Serine	-
D 1	D-Sorbitol	-
D 2	D-Mannitol	-
D 3	D-Arabitol	-
D 4	myo-Inositol	-
D 6	D-Glucose-6-PO4	-
D 7	D-Fructose-6-PO4	-
D 8	D-Aspartic Acid	-
D 9	D-Serine	-
D10	Troleandomycin	-
D11	Rifamycin SV	-
D 12	Minocycline	-
E 1	Gelatin	-
E 2	Glycyl-L-Proline	-
E 3	L-Alanine	-
E 4	L-Arginine	-
E 5	L-Aspartic Acid	-
E 6	L-Glutamic Acid	-
E 7	L-Histidine	-
E 8	L-Pyroglyutamic Acid	-
E 9	L-Serine	-
E 10	Lincomycin	-
E 11	Guanidine HCl	-
E 12	Niaproof 4	-
F 1	Pectin	-
F 2	D-Galacturonic Acid	-
F 3	L-Galactonic Acid Lactone	-
F 4	D-Gluconic Acid	-
F 5	D-Glucuronic Acid	-
F 6	Glucuronamide	-
F 7	Mucic Acid	-
F 8	Quinic Acid	-
F 9	D-Saccharic Acid	-
F 10	Vancomycin	-
F 12	Tetrazolium Blue	-
G 1	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-
G 3	D-Lactic Acid Methyl Ester	-
G 4	L-Lactic Acid	-
G 6	lpha-Keto-Glutamic Acid	-
G 7	D-Malic Acid	-
G 8	L-Malic Acid	-
G 9	Bromo-Succinic Acid	-
G 10	Nalidixic Acid	-
G 11	Lithium Chloride	-
G 12	Potassium Tellurite	-
H 2	ama-Amino-Butyric Acid	-
H 3	-Hydroxy-Butyric Acid	-
H 4	β-Hydroxy-D-Lbutyric Acid	-
H 5	Keto-Butyric Acid	-
H 6	Acetoacetic Acid	-
H 7	Propionic Acid	-
H 8	Acetic Acid	-
H 9	Formic Acid	-
H 10	Aztreonam	-
H 11	Sodium Butyrate	-
H 12	Sodium Bromate	-

Whole-genome sequencing yielded 128 scaffolds corresponding to 5,703,981 bp with a GC content of 69.3% (GCA_902652685.1). The genome was predicted to encode 5,263 genes, including 5,207 protein-coding genes and 56 RNAs (52 tRNA, three rRNA, and one tmRNA). Nucleotide BLAST (blastn suite) against the standard nucleotide collection (nr/nt) database using Megablast (optimized for highly similar sequences) of the 3,453-bp *rpoB* gene showed that strain 716A was related to the *M. simiae* complex, with 93.86% of sequence similarity to the homologous *rpoB* sequence of *Mycobacterium parascrofulaceum*. In addition, the 16S rRNA gene sequence indicated that *Mycobacterium saskatchewanense* DSM 44616, *Mycobacterium interjectum* ATCC 51457, *Mycobacterium paraense* IEC26 and *Mycobacterium palustre* DSM 44572 were the closest species to strain 716A, but with low percentage of identity (26.6%, 25.8%, 25.4% and 25.3%, respectively). In the

phylogenetic tree built using Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP), strain 716A was closest to *M. saskatchewanense* among the 19 members of the *M. simiae* complex (Figures 3). *In silico* DNA-DNA hybridization (DDH) analysis of strain 716A yielded less than 30% of identity with the different members of the *M. simiae* complex (Table 2). Moreover, the overall similarity between the strain 716A sequence and those of *M. simiae* complex members, measured with the OrthoANI algorithm, ranged between 83.3% and 78.19% (Table 3). Pan-genome analysis of strain 716A within the *M. simiae* complex yielded 36,451 genes, including 1,103 core genes, 523 soft core genes, 4,941 shell genes shared by several species, and 29,884 cloud genes unique to one species. The pan-genome tree showed that strain 716A was more closely related to *M. saskatchewanense* (Figures 4).

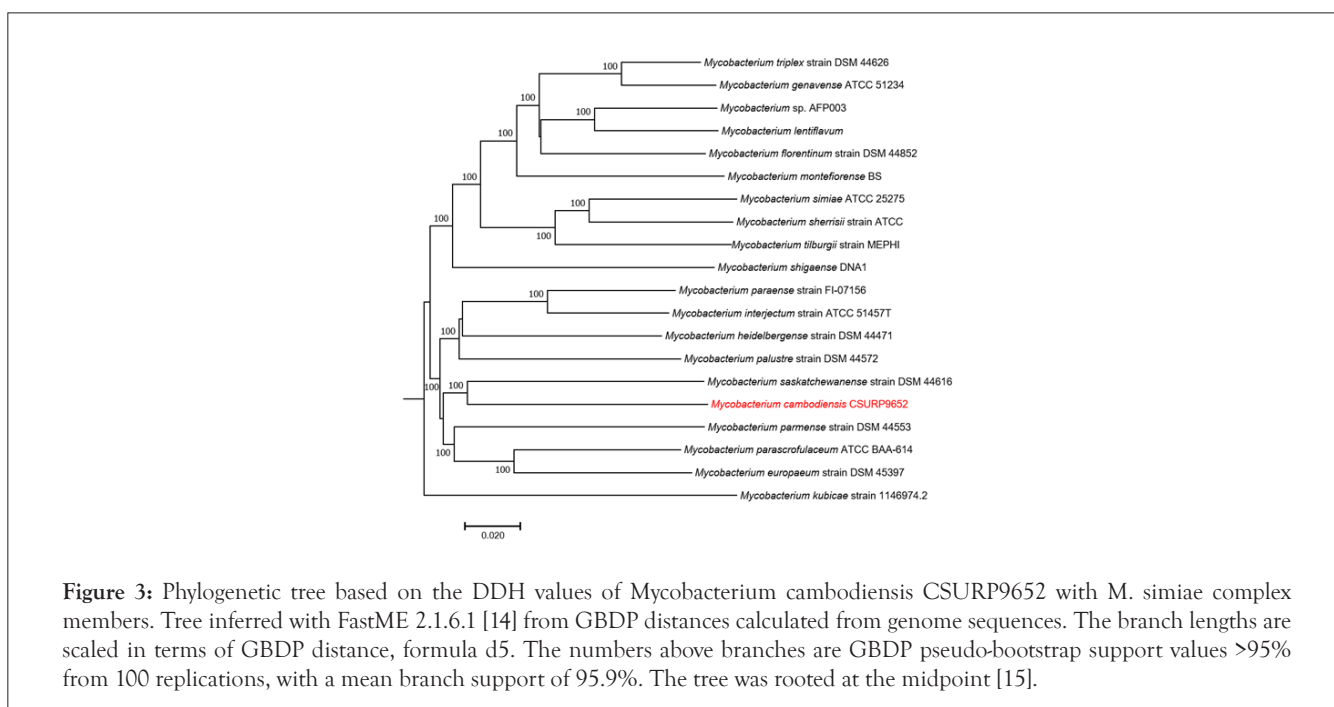
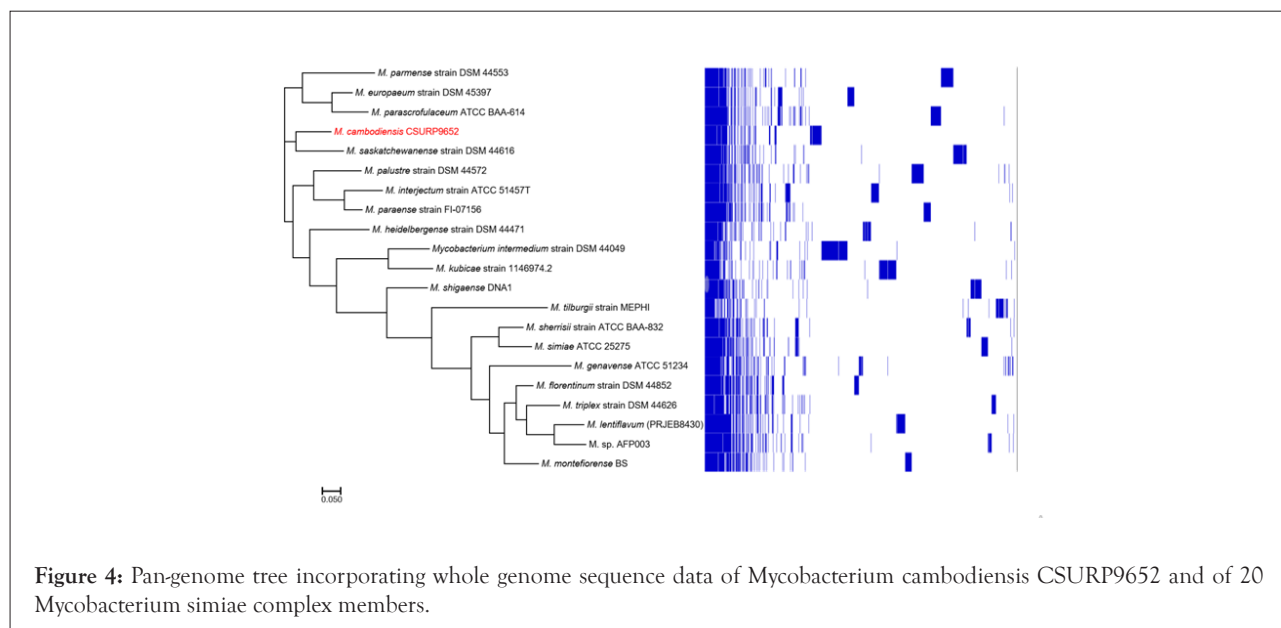


Table 2: Comparison of *Mycobacterium cambodiensis* CSURP9652 with *Mycobacterium simiae* complex members using GGDC, formula 2 (DDH estimates based on identities/high-scoring segment pair length).

Strains	CSURP9652 (DDH %)
<i>M. saskatchewanense</i> strain DSM 44616	26.6
<i>M. interjectum</i> strain ATCC 51457T	25.8
<i>M. heidelbergense</i> strain DSM 44471	25.8
<i>M. paraense</i> strain FL-07156	25.4
<i>M. palustre</i> strain DSM 44572	25.3
<i>M. parascrofulaceum</i> ATCC BAA-614	25.2
<i>M. interjectum</i> strain DSM 44064	25.2
<i>M. europaeum</i> strain DSM 45397	25
<i>M. parmense</i> strain DSM 44553	24.4
<i>M. triplex</i> strain DSM 44626	23.5
<i>M. florentinum</i> strain DSM 44852	23.2
<i>M. shigaense</i> DNA1	23.2
<i>M. genavense</i> ATCC 51234	23.1
<i>M. sp.</i> AFP003	22.9
<i>M. lentiflavum</i>	22.8
<i>M. simiae</i> ATCC 25275	22.6
<i>M. sherrisii</i> strain ATCC	22.6
<i>M. montefiorensis</i> BS	22.5
<i>M. kubiccae</i> strain 1146974.2	22.2
<i>M. intermedium</i> strain DSM 44049	21.6

Table 3: OrthoANI values of CSURP9652 with Mycobacterium simiae complex members, calculated by the Orthologous Average Nucleotide Identity tool, version.

Strains	CSURP9652 (OrthoANI %)
<i>M. saskatchewanense</i> strain DSM 44616	83.3
<i>M. heidelbergense</i> strain DSM 44471	82.78
<i>M. paraense</i> strain FI-07156	82.51
<i>M. interjectum</i> strain ATCC 51457T	82.42
<i>M. interjectum</i> strain DSM 44064	82.39
<i>M. parascrofulaceum</i> ATCC BAA-614	82.31
<i>M. palustre</i> strain DSM 44572	82.25
<i>M. europaeum</i> strain DSM 45397	81.9
<i>M. parmense</i> strain DSM 44553	81.45
<i>M. triplex</i> strain DSM 44626	80.48
<i>M. florentinum</i> strain DSM 44852	80.42
<i>M. genavense</i> ATCC 51234	80.3
<i>M. shigaense</i> DNA1	80.27
<i>M. sp.</i> AFP003	79.98
<i>M. lentiflavum</i>	79.81
<i>M. montefiorensis</i> BS	79.75
<i>M. sherrisii</i> strain ATCC	79.65
<i>M. simiae</i> ATCC 25275	79.55
<i>M. kubicae</i> strain 1146974.2	79
<i>M. intermedium</i> strain DSM 44049	78.19



DISCUSSION

NTM are ubiquitous environmental bacteria [16] that may act as opportunistic pathogens. Lung infection is the most encountered clinical situation [17], and sometimes mimics pulmonary tuberculosis, like in the patient described in this study [18]. Indeed, strain 716A was isolated from a bronchoalveolar specimen collected from a Cambodian patient with suspected pulmonary tuberculosis. In low-income countries, especially those with endemic tuberculosis, such as Cambodia, lung infections are generally considered to be caused by tuberculosis. Therefore, respiratory diseases caused by other bacteria, including NTM, escape detection and this facilitates their spread in the community.

Whole-genome sequence analyses confirmed that strain 716A was a new member of the *M. simiae* complex, in agreement with its

unique phenotypic characteristics. We named this new species *Mycobacterium cambodiensis* sp. nov. (cam.bo.di.en'sis N.L. adj. neutr. *cambodiensis*, of Cambodia, the country where the strain was sampled).

M. simiae was first isolated from Rhesus macaques in Hungary in 1965 [19]. To date, there are 23 species belonging to the *M. simiae* complex. Eight of these species have been isolated from sputum, five from cervical lymph nodes, three from tomato plant roots, two from fishes, one from blood, one from rhesus macaques, one from water, one from bone marrow and one from an unknown human clinical source (Table 4). Among these species, six have been described after 2011 (one in 2017, three in 2018 and two in 2019), indicating that the *M. simiae* complex is a rapidly expanding complex of mycobacteria.

Table 4: Synopsis of the *M. simiae* complex species characterized since 1965.

Species	Isolation source	Clinical presentation	Isolation year	Characterization year	Isolation site	Growth	Ref
<i>M. simiae</i>	Rhesus macaques	ND	ND	1965	Hungary	SGM	[19]
<i>M. intermedium</i>	Sputum	Lung disease	ND	1993	Germany	SGM	[20]
<i>M. interjectum</i>	lymph node	Chronic lymphadenitis	ND	1993	Germany	SGM	[21]
<i>M. genavense</i>	Blood, bone marrow, liver, spleen, intestine, lymph node	Fever, diarrhea, and weight loss	ND	1993	Geneva	SGM	[22]
<i>M. triplex</i>	Lymph node	ND	ND	1996	USA	SGM	[23]
<i>M. lentiflavum</i>	sputum, gastric juice, urine	Spondylodiscitis	1991–1993	1996	USA	SGM	[24]
<i>M. heidelbergense</i>	Cervical lymph nodes	Lymphadenitis	ND	1997	Germany	SGM	[25]
<i>M. kubicae</i>	Respiratory specimen	ND	1994–1997	2000	USA	SGM	[26]
<i>M. palustre</i>	Water	ND	1993	2002	Finland	SGM	[27]
<i>M. montefiorensis</i>	Moray eels	Granulomatous skin disease	2001	2003	USA	SGM	[28]
<i>M. parmense</i>	Cervical lymph node	Local swelling of Submandibular what?	1999	2004	Italia	SGM	[29]
<i>M. sherrisii</i>	Clinical specimen	ND	1975	2004	USA	SGM	[30]
<i>M. saskatchewanense</i>	Sputum and pleural fluid	Bronchiectasis	2000	2004	Canada	SGM	[31]
<i>M. parascrofulaceum</i>	Sputum and bronchoscopy samples	Tuberculosis symptoms except for a dry cough	2002	2004	Canada	SGM	[32]
<i>M. florentinum</i>	Cervical lymph node	Lymphadenopathy	1993	2005	Italia	SGM	[33]
<i>M. stomatepiae</i>	Stomatepia mariae spleen tissue	Granulomatous lesions in spleen	ND	2008	London, UK	SGM	[34]
<i>M. europaeum</i>	Sputum	Cavitary pneumopathy	1995	2011	Italy, Florence	SGM	[35]
<i>M. paraense</i>	Sputum	Respiratory symptoms	ND	2015	Brazil	SGM	[36]
<i>M. ahwazicum</i>	Sputum	Chronic lung disease	2009	2017	Iran	SGM	[37]
<i>M. terramassiliense</i> , <i>M. rhizamassiliense</i> and <i>M. numidiamassiliense</i>	Tomato plant roots	ND	ND	2018	France	SGM	[38]
<i>M. tilburgii</i> strain MEPHI	Bone marrow	ND	ND	2019	Ireland	Uncultured	[39]
<i>M. cambodiensis</i>	Sputum	Suspicion of clinical tuberculosis	2013	2019	Cambodia	SGM	This work

Note: SGM: Slow Growing Mycobacteria, ND: No Data.

CONCLUSION

In conclusion, our data indicated that *M. cambodiensis* was a new species belonging to the *M. simiae* complex. This discovery added a new species to the list of species of the genus *Mycobacterium* responsible for pulmonary infections. The main aim behind the study to interpret a Clinical strain of *Mycobacterium cambodiensis* sp. is interesting. The study provides limited new information that *Mycobacterium cambodiensis* was a new species belonging to the *Mycobacterium simiae* complex.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was also supported by the French Government under

the Investissements d'Avenir (Investments for the Future) program managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, fr: National Agency for Research), [reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03]. Fatah Tazerart benefits from a PhD grant offered by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research under the Exceptional National Program (P.N.E.) and the University of Blida 1. The authors acknowledge Hitachi (Toyo, Japan) for providing the laboratory with electron microscopes used in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.T. performed the laboratory manipulations and phenotypic characterization of the new species. J.S. carried out Genome

characterization and bio-informatics analysis. F.T. and J.S. wrote the main manuscript text, put tables and figures. F.T., J.S. and M.D. conceived the methodology. M.M. carried out the Biolog analyses, processed the data and made the interpretation on software, S.B. made phenotypic and antibiotic susceptibility testing. S.G. and M.D. supervised the phenotypic, genomic, and genetic characterization of the new species. All authors reviewed the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICS STATEMENT

None required.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available at GenBank under accession numbers: *Mycobacterium cambodiensis* (GCA_902652685.1).

REFERENCES

1. WHO. World Health Organization Global Tuberculosis Report, World Health Organization. 2019a.
2. Prem K, Pheng SH, Teo AK, Evdokimov K, Nang EE, Hsu LY, et al. Spatial and temporal projections of the prevalence of active tuberculosis in Cambodia. *BMJ glob health*. 2019; 4(1):e001083.
3. WHO. World Health Organization. Tuberculosis Country, Regional and Global Profiles: Cambodia.2019b.
4. Khann S, Mao ET, Yadav RP. Non-tuberculosis mycobacteria: Trend of isolation rate and characteristics of NTM in Cambodia during 2011–2013. *Int J Mycobacteriology*. 2015; 4:39.
5. Bonnet M, San KC, Pho Y, Sok C, Dousset JP, Brant W, et al. Nontuberculous mycobacteria infections at a provincial reference hospital, Cambodia. *Emerg infect dis*. 2017; 23(7):1139-1147.
6. Bouzid F, Osman DA, Baptiste E, Delerce J, Hassan MO, Arreh WI, et al. Pulmonary Isolation of Multidrug resistant “*Mycobacterium simulans*” and *Mycobacterium tuberculosis* from a patient in the Horn of Africa. *Sci rep*. 2018; 8(1):1-1.
7. Bochner BR. Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS microbial rev*. 2008; 33(1):191-205.
8. Wang J, Chen WF, Li QX. Rapid identification and classification of *Mycobacterium* spp. using whole-cell protein barcodes with matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in comparison with multigene phylogenetic analysis. *Anal chim acta*. 2012; 716:133-137.
9. Zingue D, Flaudrops C, Drancourt M. Direct matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria from colonies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35: 1983–1987.
10. Angelakis E, Roux V, Raoult D, Rolain JM. Real-time PCR strategy and detection of bacterial agents of lymphadenitis. *Eur j clin microbiol infect dis*. 2009; 28(11):1363-1368.
11. Saad J, Drancourt M, Hannan MM, Stapleton PJ, Grandjean Lapierre S. Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Strain MEPHI. *Microbiol resour announc*. 2019; 8(40):e00933-19.
12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J comput biol*. 2012; 19(5):455-477.
13. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014; 30(14):2068-2069.
14. Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol biol evol*. 2015; 32(10):2798-2800.
15. Farris JS. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *The American Naturalist*. 1972; 106(951): 645–668.
16. Friedman DZ, Cervera C, Halloran K, Tyrrell G, Doucette K. Non-tuberculous mycobacteria in lung transplant recipients: Prevalence, risk factors, and impact on survival and chronic lung allograft dysfunction. *Transpl infect dis*. 2020; 22(2):e13229.
17. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am j respir crit care med*. 2007;175(4):367-416.
18. Agizew T, Boyd R, Mathebula U, Mathoma A, Basotli J, Serumola C, et al. Outcomes of HIV-positive patients with non-tuberculous mycobacteria positive culture who received anti-tuberculous treatment in Botswana: Implications of using diagnostic algorithms without non-tuberculous mycobacteria. 2020; 15(6):e0234646.
19. Karassova VA, Weissfeiler J, Krasznay E. Occurrence of atypical mycobacteria in Macacus rhesus. *Acta microbiol Acad Sci Hung*. 1965; 12(3):275-282.
20. Meier A, Kirschner P, Schröder KH, Wolters J, Kroppenstedt RM, Böttger EC, et al. *Mycobacterium intermedium* sp. nov. *I J Syst Microbiol*. 1993; 43(2):204-209.
21. Lumb R, Goodwin A, Ratcliff R, Stapledon R, Holland A, Bastian I, et al. Phenotypic and molecular characterization of three clinical isolates of *Mycobacterium interjectum*. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(11):2782-2785.
22. Böttger EC, Hirschel B, Coyle MB. *Mycobacterium genavense* sp. nov. *Int j syst bacteriol* 1993;43: 841–843.
23. Floyd MM, Guthertz LS, Silcox VA, Duffey PS, Jang Y, Desmond EP, et al. Characterization of an SAV organism and proposal of *Mycobacterium triplex* sp. nov. *J clin microbiol*. 1996; 34(12): 2963–2967.
24. Springer B, Wu WK, Bodmer T, Haase G, Pfyffer GE, Kroppenstedt RM, et al. Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(5):1100-1107.
25. Haas WH, Butler WR, Kirschner P, Plikaytis BB, Coyle MB, Amthor B, et al. A new agent of mycobacterial lymphadenitis in children: *Mycobacterium heidelbergense* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(12):3203-3209.
26. Floyd MM, Gross WM, Bonato DA, Silcox VA, Smithwick RW, Metchock B, et al. *Mycobacterium kubicae* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic Mycobacterium. *Int j syst and evol microbiol*. 2000; 50(5):1811-1816.
27. Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E, Tortoli E, Suutari M, Seppänen J, et al. *Mycobacterium palustre* sp. nov., a potentially pathogenic, slowly growing mycobacterium isolated from clinical and veterinary specimens and from Finnish stream waters. *Int j syst evol microbiol*. 2002; 52(5):1519-1525.
28. Levi MH, Bartell J, Gandolfo L, Smole SC, Costa SF, Weiss LM, et al. Characterization of *Mycobacterium montefiorensis* sp. nov., a novel pathogenic mycobacterium from moray eels that is related to *Mycobacterium triplex*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(5):2147-2152.
29. Fanti F, Tortoli E, Hall L, Roberts GD, Kroppenstedt RM, Dodi I, et al. *Mycobacterium parmense* sp. nov. *Int j syst evol microbiol*. 2004; 54(4):1123-1127.

30. Selvarangan R, Wu WK, Nguyen TT, Carlson LD, Wallis CK, Stiglich SK, et al. Characterization of a novel group of mycobacteria and proposal of *Mycobacterium sherrisii* sp. nov. *J clin microbiol.* 2004; 42(1):52-59.
31. Turenne CY, Cook VJ, Burdz TV, Pauls RJ, Thibert L, Wolfe JN, et al. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *Int j syst evol microbiol.* 2004; 54(5):1543-1551.
32. Turenne CY, Thibert L, Williams K, Burdz TV, Cook VJ, Wolfe JN, et al. *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.* 2004; 54(3):659-667.
33. Tortoli E, Rindi L, Goh KS, Katila ML, Mariottini A, Mattei R, et al. *Mycobacterium florentinum* sp. nov., isolated from humans. *Int j syst evol microbiol.* 2005; 55(3):1101-1106.
34. Pourahmad F, Cervellione F, Thompson KD, Taggart JB, Adams A, Richards RH, et al. *Mycobacterium stomatepiae* sp. nov., a slowly growing, Non-Chromogenic species isolated from Fish. *Int j Syst Evol Microbiol.* 2008; 58(12): 2821-2827.
35. Tortoli E, Böttger EC, Fabio A, Falsen E, Gitti Z, Grottola A, et al. *Mycobacterium europaeum* sp. nov., a scotochromogenic species related to the *Mycobacterium simiae* complex. *Int j syst evol microbiol.* 2011; 61(7):1606-1611.
36. Da Costa AR, Fedrizzi T, Lopes ML, Pecorari M, Da Costa WL, Giacobazzi E, et al. Characterization of 17 strains belonging to the *Mycobacterium simiae* complex and description of *Mycobacterium paraense* sp. nov. *Int j syst evol microbiol.* 2015; 65:656-662.
37. Bouam A, Armstrong N, Levasseur A, Drancourt M. *Mycobacterium terramassiliense*, *Mycobacterium rhizamassiliense* and *Mycobacterium numidiamassiliense* sp. nov., three new *Mycobacterium simiae* complex species cultured from plant roots. *Sci rep.* 2018; 8(1):1-3.
38. Bouam A, Heidarieh P, Shahraki AH, Pourahmad F, Mirsaeidi M, Hashemzadeh M, et al. *Mycobacterium ahvazicum* sp. nov., the nineteenth species of the *Mycobacterium simiae* complex. *Sci rep.* 2018; 8(1):1-2.
39. Saad J, Phelippeau M, Khoder M, Lévy M, Musso D, Drancourt M, et al. “*Mycobacterium mephnesia*”, a *Mycobacterium terrae* complex species of clinical interest isolated in French Polynesia. *Sci rep.* 2019; 9(1):1-1.