

TUBERCULOSE BOVINE : BILAN GENOTYPIQUE DE *M. BOVIS* A L'ORIGINE DES FOYERS BOVINS ENTRE 2015 ET 2017 EN FRANCE METROPOLITAINE

Lorraine Michelet ¹, Benoît Durand ², Maria Laura Boschioli ¹

Auteur correspondant : maria-laura.boschioli@anses.fr

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

² Anses, Laboratoire de santé animale, Unité Epidémiologie, Maisons-Alfort, France

Résumé

Le génotypage de souches de *Mycobacterium bovis* fournit des informations qui permettent de suivre la transmission de la tuberculose bovine dans l'espace et dans le temps. Les génotypes de *M. bovis* de foyers bovins en France entre 2015 et 2017 ont été identifiés par spoligotypage et typage VNTR (Variable Number Tandem Repeat). Parmi les 273 souches étudiées, 21 génotypes ont pu être différenciés, dont deux représentaient plus de la moitié des souches. En règle générale, la régionalisation des génotypes demeure une caractéristique clef. Comme décrit précédemment, on a pu mettre en évidence pendant cette période la présence de génotypes classiques en France, mais également ceux à apparition intermittente, ainsi que des génotypes décrits plus récemment et d'origine inconnue, ou encore d'autres introduits de pays voisins. Cette grande variabilité génétique couplée à la forte régionalisation de certains génotypes fait du typage moléculaire un outil performant pour établir des hypothèses sur l'origine des foyers de tuberculose bovine en France.

Mots clés : *Mycobacterium bovis*, génotypage, spoligotypage, typage VNTR

Abstract

Bovine tuberculosis: genotyping results of the causative *M. bovis* agent of bovine tuberculosis outbreaks between 2015 and 2017 in metropolitan France

Genotyping of *Mycobacterium bovis* provides information for following-up bovine tuberculosis transmission in space and time. The genotypes of *M. bovis* that gave rise to bovine tuberculosis outbreaks between 2015 and 2017 were identified by spoligotyping and VNTR typing. Among 273 *M. bovis*, 21 genotypes were differentiated, of which two representing more than half of the strains. Most of the time, genotypes' regionalization remains a key characteristic. As described previously, classical French genotypes were mainly detected during this period, but also sporadic ones, together with more recently described genotypes of unknown origin or those that were introduced from neighboring countries. This great genetic variability coupled with the strong regionalization of the genotypes makes molecular typing a powerful tool for establishing hypothetical outbreak origins of bovine tuberculosis in France.

Keywords : *Mycobacterium bovis*, genotype, spoligotyping, VNTR typing

CONTEXTE

Le génotypage de *Mycobacterium bovis* permet d'étudier la dynamique de la tuberculose bovine et de mieux comprendre la nature complexe de cette maladie en apportant des éléments pour déchiffrer l'origine des foyers. Les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, auquel appartiennent *Mycobacterium bovis*, ainsi que *Mycobacterium caprae* et *Mycobacterium tuberculosis*, sont considérées comme des agents de la tuberculose bovine. Du fait de leur reproduction asexuée et de l'absence d'échange de matériel génétique entre elles, ces mycobactéries sont très clonales et peu variables dans le temps rendant ainsi les études d'épidémiologie moléculaire sur la base de certains caractères génotypiques très informatives.

Le génotypage aide à la reconstruction de possibles séquences d'infection, très difficiles à établir pour une maladie comme la tuberculose. En effet, l'animal peut héberger le bacille parfois pendant de longues périodes et être contagieux sans pour autant être identifié comme étant infecté. Le génotypage apporte des informations complémentaire aux enquêtes épidémiologiques classiques et permet très fréquemment de confirmer les origines de foyers quand il s'agit d'introduction d'animaux, de résurgence ou par contact du fait du voisinage. Dans cet article, le génotypage a été réalisé par spoligotypage et VNTR (Variable Number Tandem Repeat) et les cartes ont été construites à l'aide du logiciel QGIS 3.6.

Cet article décrit la distribution spatio-temporelle des souches ou du matériel génétique de *M. bovis* identifiées dans des foyers bovins entre 2015 et 2017.

Encadré. Méthodes de typage

Le génotype d'une souche de *M. bovis* est déterminé par l'utilisation en parallèle de deux techniques de typage moléculaire, le spoligotypage et le typage VNTR (Variable Number Tandem Repeat).

Spoligotypage

C'est la méthode la plus utilisée pour génotyper des souches de *M. bovis*. Elle permet d'identifier le polymorphisme dans une zone du génome appelée DR (Direct Repeats) caractérisée par la présence ou l'absence de séquences appelées espaceurs (spacers) dont la position au sein des région DR est fortement conservée. Pour l'identification, la région DR est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) et la caractérisation de la souche est basée sur la détection ou l'absence de détection de 43 espaceurs. Les profils obtenus sont alors comparés avec la base internationale Mbovis.org pour permettre la caractérisation de la souche. De plus, les profils de spoligotypage permettent de reconstruire des événements évolutifs de manière assez fiable puisque la région DR est très stable.

Typage-VNTR

La technique VNTR identifie la taille des séquences répétées en tandem localisées dans une région génomique d'intérêt. Cette technique est basée sur l'amplification par PCR des séquences répétées en tandem dans ces régions. En France, huit régions génomiques d'intérêt sont caractérisées pour les souches de *M. bovis*, dont six sont utiles pour comparer des souches d'origines géographiques différentes comme préconisé par le consortium européen Venomyc. Les deux autres régions sont également utilisées parce qu'elles présentent une forte variabilité au sein des populations de souches françaises (Hauer *et al.*, 2015). Pour chaque souche de *M. bovis*, le résultat est donné sous forme d'une chaîne de caractères à huit chiffres qui définissent le profil de la souche. Ces régions génomiques ont un taux de changement plus rapide que la zone DR, signifiant ainsi que les profils VNTR permettent une analyse plus fine des souches et des événements évolutifs qui les séparent.

Références bibliographiques

Hauer A., De Cruz K., Cochard T., Godreuil S., Karoui C., Henault S., et al, 2015. Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. PLoS One. 10(2):e0117103. doi: 10.1371/journal.pone.0117103.

RESULTATS

Génotype des souches ayant provoquées des foyers de tuberculose bovine en 2015, 2016 et 2017

Pendant ces trois années, le LNR a confirmé l'infection par *Mycobacterium bovis* par diagnostic moléculaire dans 273 des 286 foyers déclarés. Les génotypes (spoligotypage + VNTR) de *M. bovis* ont pu être déterminés pour 257 foyers (Tableau 1). Vingt et un génotypes différents ont été répertoriés, avec le même phénomène de régionalisation de souches que les années précédentes (Boschioli *et al.*, 2015) (Tableau 2 et Figures 1 et 2).

Tableau 1. Nombre de foyers par année

	2015	2016	2017	Total
Foyers déclarés	100	91	95	286
Foyers confirmés par le LNR	98	85	90	273
Foyers typés	93	77	87	257

- ***Les génotypes dominants***

Les foyers de la région Nouvelle-Aquitaine représentent approximativement 75 % des foyers déclarés entre 2015 et 2017, et concentrent 43 % (9) des génotypes identifiés : BCG-NAq, F7, F15, F4, F5, F41, SB0999 et F70. Entre 2015 et 2017, le génotype BCG Nouvelle-Aquitaine (BCG-NAq) (92 foyers, 38,5 %) suivi par le génotype F7 des Pyrénées-Atlantiques-Landes (45 foyers, 18,8 %) étaient les deux génotypes les plus fréquents, comme nous l'avions déjà observé en 2014. Le génotype BCG-NAq est par ailleurs le plus répandu d'un point de vue géographique avec le plus grand nombre de départements touchés. Ainsi les départements de la Dordogne, de la Charente, de la Haute-Vienne mais également la Charente-Maritime sont prioritairement affectés par ce génotype très répandu dans les élevages de race Limousine.

- ***Les génotypes classiques***

D'autres génotypes très ancrés régionalement ont été identifiés dans un nombre important des foyers au cours de cette période. Le BCG-Côte d'Or (21 foyers, 8,8 %) en est un exemple, même si on constate une forte diminution de ce génotype dans le temps, avec douze foyers en 2015, six en 2016 et seulement trois en 2017, ce qui illustre l'efficacité de la lutte dans ce département (voir l'article de Delavenne *et al.* dans ce même numéro). En Corse (26 foyers au cours de la période), le génotype F1 est largement prédominant (22 foyers, 9,2 %) comparé au génotype BCG-Corse qu'on trouve plus rarement dans ce département (4 foyers). Par ailleurs, même si le génotype F15 était régulièrement identifié dans les Pyrénées-Atlantiques ces dernières années (Hauer *et al.*, 2015), on a observé entre 2015 et 2017 une recrudescence des foyers de ce type dans ce département (20 foyers, 8,4 %).

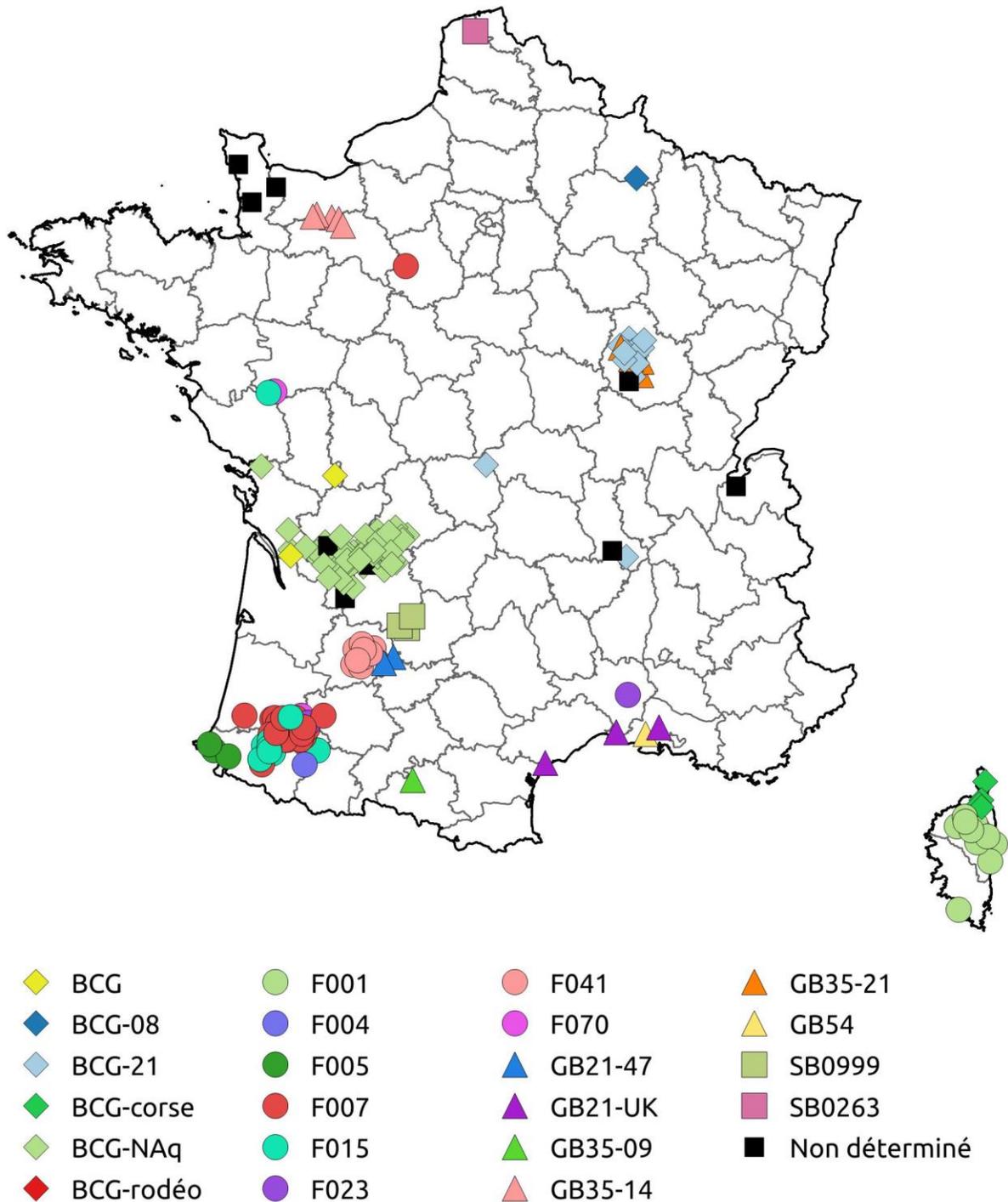


Figure 1. Répartition géographique des génotypes de *M. bovis* identifiés en élevages bovins en France métropolitaine entre 2015 et 2017

L'ensemble de ces six génotypes dominants ou classiques représentent approximativement 84 % des foyers de tuberculose de la période 2015-2017.

Des génotypes moins fréquents, identifiés dans 30 foyers pendant cette période, comme le F4 ou le F5 dans les Pyrénées-Atlantiques (1 et 8 foyers respectivement), le GB35 en Ariège-Haute-Garonne (3 foyers), le GB35 dans le Calvados (5 foyers), le GB35 en Côte-d'Or (6 foyers), le BCG-Ardenne dans les Ardennes (1 foyer), le F41 dans le Lot-et-Garonne (5 foyers), le SB0999 dans le sud de la Dordogne (1 foyer), avaient déjà été identifiés dans ces mêmes départements en 2014 (Cavalerie *et al.*, 2015).

- **Les génotypes intermittents**

D'autres génotypes très locaux mais moins fréquents que les précédents ont été également identifiés entre 2015 et 2017. Un foyer de génotype F23 a été découvert dans un cheptel du Gers. Ce génotype avait déjà été mis en évidence chez un animal né dans le Gers mais trouvé infecté dans un cheptel landais en 2008, foyer qui était en lien épidémiologique avec le foyer du Gers de 2015. Le génotype GB21-47 a également été identifié dans deux foyers du Lot-et-Garonne, alors que le dernier foyer dû à ce génotype avait été identifié en 2010 (Hauer *et al.*, 2015).

Tableau 2 : Détails des génotypes identifiés entre 2015 et 2017

Génotype	Spoligotype	VNTR	2015	2016	2017	Total
<i>BCG</i>	<i>BCG - SB0120</i>	-	2			2
BCG-Ardenne	BCG - SB0120	5 3 5 6 11 4 6 8	1			1
BCG-Côte-d'Or	BCG - SB0120	5 5 4 3 11 4 5 6	12	6	3	21
BCG-Rodéo	BCG - SB0120	5 4 5 3 11 3 4 4	2			2
BCG-Corse	BCG - SB0120	4 5 5 3 11 4 5 7	1	3		4
BCG-NAq	BCG - SB0120	5 3 5 3 9 4 5 6	31	21	40	92
F1	F1 - SB0840	7 5 5 3 8 2 5s 4	12	6	4	22
F4	F4 - SB0818	5 4 5 3 10 1 5s 11		1		1
F5	F5 - SB0826	6 6 3 3 10 2 5s 8	4	3	1	8
F7	F7 - SB0821	6 5 5 3 11 2 5s 8	11	17	17	45
F15	F15 - SB0832	6 5 5 3 11 2 4s 8	5	7	8	20
F23	F23 - SB0827	6 5 5 3 11 2 4s 8	1		1	2
F41	F41 - SB0823	6 5 5 3 11 2 5s 6	1	4	6	11
F70	F70 - SB0295	6 4 5 3 11 2 5 7	1		1	2
GB21-47	GB21 - SB0130	4 3 5 3 9 3 4 11		2		2
GB21-UK	GB21 - SB0130	3 5 5 3 10 2 4 10		2	1	3
GB35-Ariège-Haute-Garonne	GB35 - SB0134	6 5 5 3 6 4 5 6	3	0	0	3
GB35-Calvados	GB35 - SB0134	3 5 5 3 10 4 5 5	2	1	2	5
GB35-Côte-d'Or	GB35 - SB0134	6 4 5 3 6 4 3 6	3	3		6
GB54	GB54 - SB0121	5 2 5 3 8 2 5 7			1	1
SB0263	SB0263	7 5 5 4 10 4 4 9		1		1
SB0999	SB0999	6 4 5 2 8 2 4 7	1	0	2	3
Total génotypes			16	14	13	22
Total entités			93	77	87	257

- ***Les génotypes introduits***

Une comparaison entre les profils VNTR des souches isolées à partir de bovins de race Aberdeen Angus issus des Iles Britanniques et introduits en France depuis plusieurs années et les profils dans les bases de données du Royaume-Uni, a permis de confirmer que ces introductions étaient bien à l'origine de ces foyers en France en 2016 et en 2017. La souche F70 identifiée dans une ganaderia dans les Landes en 2015 est un autre exemple de souche introduite. Ce génotype avait déjà été identifié dans ce département en 2012, également en lien avec l'élevage d'animaux de combat et correspond à un génotype hispanique identifié également dans des manades en Camargue (Boschiroli *et al.*, 2015). Ce même génotype F70 a également été identifié en 2017 dans le Maine-et-Loire dans un élevage engraisseur où un animal infecté par une souche F15 a également été détecté. Les animaux à l'origine de ces cas étaient tous les deux originaires du Sud-Ouest. Un autre génotype hispanique (GB54) a également été identifié en 2017 dans une manade en Camargue suite à l'introduction d'un animal de combat.

- ***Les génotypes récents***

Un profil SB0263, identifié pour la première fois en France dans un foyer du département du Nord en 2012 puis en Seine-Maritime en 2014, a été de nouveau identifié en 2016 dans le Pas-de-Calais. Aucun lien épidémiologique classique n'a été identifié entre ces trois foyers. Un tout autre profil original a été découvert en 2016 pour la première fois. Il s'agit du profil BCG-Rodéo, retrouvé chez des animaux de deux établissements de type ranch-rodéo en Normandie et ayant un lien épidémiologique. Cependant l'origine de ces deux nouvelles souches n'a pas pu être déterminée. En effet, il est difficile d'établir un lien avec d'autres profils génotypiques en France ou à l'étranger faute de données permettant de relier ces foyers à de possibles introductions d'animaux en provenance d'autres pays.

- ***Les génotypes non-déterminés***

Pour un foyer dans le département des Deux-Sèvres et un autre en Charente-Maritime, le spoligotype BCG a pu être déterminé mais le type VNTR n'a pas pu être défini.

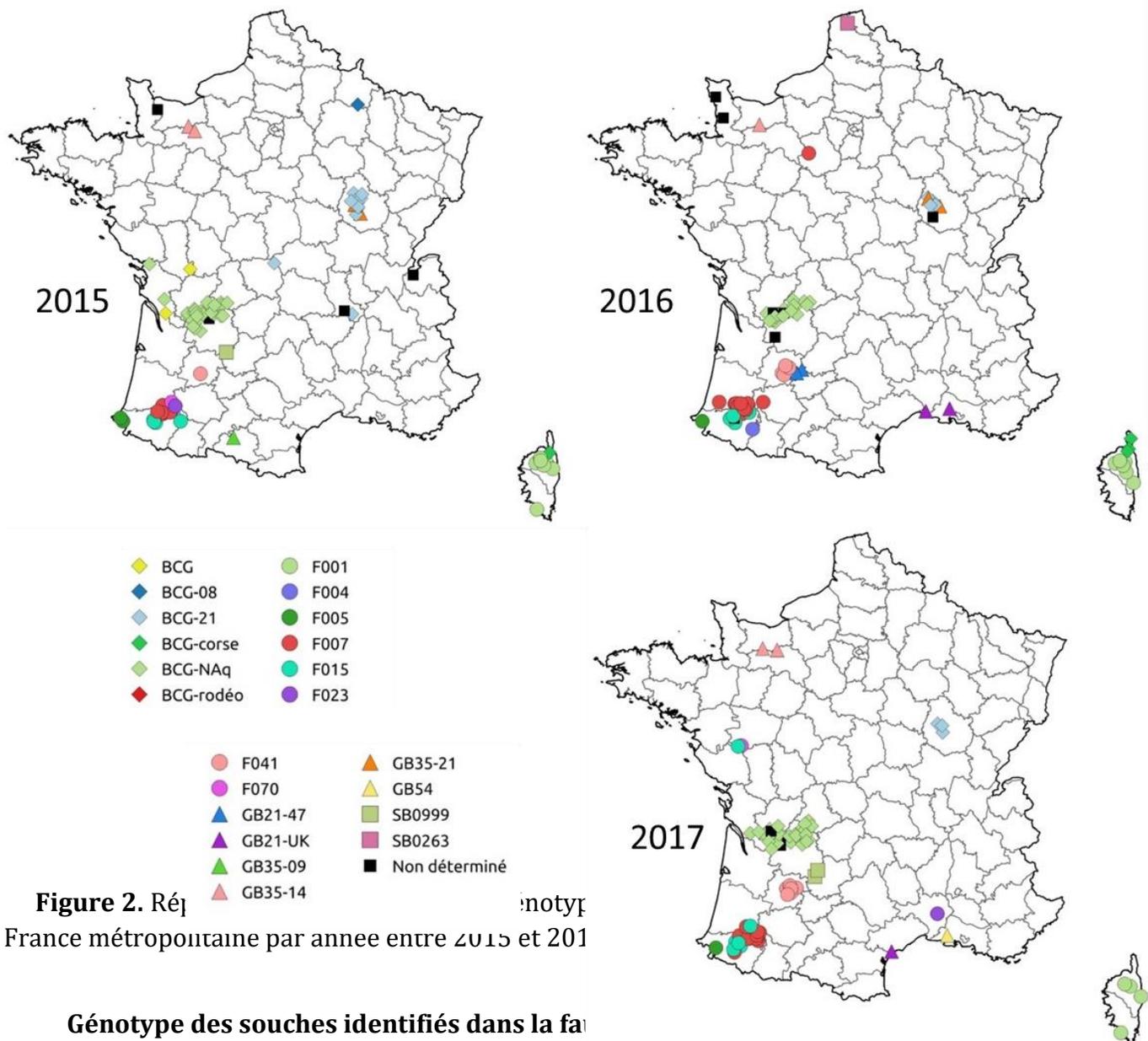


Figure 2. Répartition géographique des génotypes de *M. bovis* en France métropolitaine par année entre 2015 et 2017.

Génotype des souches identifiés dans la faune sauvage

Concernant la faune sauvage, douze des 21 génotypes identifiés dans des foyers bovins ont également été identifiés (voir article de Desvaux *et al.* dans ce même numéro). C'est principalement le cas pour les génotypes les plus représentés entre 2015 et 2017 : BCG Nouvelle Aquitaine, BCG Côte d'Or, BCG Ardennes et BCG Corse, GB35 Ariège et GB35 Côte d'Or, F1, F7, F41, F15, F5 et SB0999 dans cette période, qui ont été identifiés dans les mêmes localisations que pour les foyers bovins (Réveillaud, 2018).

CONCLUSION

Entre 2015 et 2017 les souches de *M. bovis* identifiées dans les foyers de tuberculose bovine en France appartenaient à un petit nombre de génotypes, avec une persistance fortement localisée. Certains génotypes moins fréquents ont été identifiés de manière régulière en 2015, 2016 et

2017, ce qui montre également une pérennisation de l'infection dans les régions concernées. Le phénomène d'intermittence d'apparition de génotypes plus rares dans certaines zones interpelle sur l'efficacité du dépistage et de l'assainissement dans ces régions. De plus, la découverte de nouveaux génotypes suggère que l'introduction d'animaux depuis d'autres pays constitue également un risque.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les laboratoires vétérinaires départementaux du réseau tuberculose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Boschioli, M. L., Michelet L., Hauer A., De Cruz K., Courcoul A., Hénault S., Palisson A., Karoui C., Biet F., and Zanella G. 2015. « Tuberculose bovine en France : cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000-2013 ». *Bulletin Epidémiologie Santé Animale et Alimentation* 70, 2-8.

Cavalerie, L., Courcoul, A., Boschioli, M., Réveillaud, E., Gay, P. 2015. « Tuberculose bovine en France en 2014 : une situation stable ». *Bulletin Epidémiologie Santé Animale et Alimentation* 71, 4-11.

Hauer A., De Cruz K., Cochard T., Godreuil S., Karoui C., Henault S., et al. 2015. « Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978". *PLoS One* 10(2):e0117103. doi: 10.1371/journal.pone.0117103.

Réveillaud É., Desvaux S., Boschioli ML., Hars J., Faure É., Fediaevsky A., Cavalerie L., Chevalier F., Jabert P., Poliak S., Tourette I., Hendrikx P., Richomme C. 2018. « Infection of Wildlife by *Mycobacterium bovis* in France Assessment Through a National Surveillance System, Sylvatub". *Front in Veterinary Sciences* 30;5:262. doi:10.3389/fvets.2018.00262.