

RESEARCH ARTICLE

Broad diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from humans and cattle in Northern Algeria suggests a zoonotic transmission cycle

Hanane Damene¹, Djamel Tahir^{1,2}, Maren Diels³, Ali Berber¹, Naima Sahraoui¹, Leen Rigouts^{4,5*}

1 Institute of Veterinary Sciences, University Blida 1, Blida, Algeria, **2** IHU Méditerranée Infection, Marseille, France, **3** BCCM/ITM Mycobacterial Culture collection, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, **4** Mycobacteriology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, **5** Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

* LRigouts@itg.be



OPEN ACCESS

Citation: 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>

Editor: Johan Van Weyenbergh, KU Leuven, BELGIUM

Received: August 14, 2020

Accepted: October 15, 2020

Published: November 30, 2020

Copyright: © 2020 Damene et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: HD was funded by the Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Algeria (Grant Number C1211404). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) comprises closely related species responsible for human and animal tuberculosis (TB). Efficient species determination is useful for epidemiological purposes, especially for the elucidation of the zoonotic contribution. In Algeria, data on MTBC genotypes are largely unknown. In this study, we aimed to investigate the occurrence and diversity of MTBC genotypes causing human and bovine TB in Northern Algeria. During a two-year sampling period (2017–2019) in two regions of Northern Algeria, we observed an overall prevalence of 6.5% of tuberculosis (TB) among slaughtered cattle, which is higher than previous Algerian data yet comparable to neighboring countries. A total of 296 *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) isolates were genotyped by spoligotyping: 181 from tissues with TB-like lesions collected from 181 cattle carcasses and 115 from TB patients. In human isolates, we identified 107 *M. tuberculosis*, seven *M. bovis* and one “*M. pinnipedii*-like”, while for bovine samples, 174 isolates were identified as *M. bovis*, three as *M. caprae*, three as “*M. pinnipedii*-like” and one as “*M. microti*-like”. The majority of isolates (89.2%) belonged to 72 different known Shared International Types (SIT) or *M. bovis* spoligotypes (SB), while we also identified seven new SB profiles (SB2695 to SB2701). Twenty-eight of the SB profiles were new to Algeria. Our data suggest zoonotic transmission in Sétif, where significantly more TB was observed among cattle (20%) compared to the slaughterhouses from the three other regions (5.4%–7.3%) ($p < 0.0001$), with the isolation of the same *M. bovis* genotypes from TB patients. The present study showed a high genetic diversity of MTBC isolated from human and cattle in Northern Algeria. Even though relatively small in terms of numbers, our data suggest the zoonotic transmission of TB from cattle to humans, suggesting the need for stronger eradication strategies for bovine TB.

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

Author summary

To establish the circulating genotypes causing human and bovine tuberculosis (TB) in Northern Algeria, spoligotyping was used to characterize 296 *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of human (n = 115) and bovine (n = 181) origin. Molecular identification showed that most human isolates were identified as *M. tuberculosis*, with few *M. bovis* isolates, while among cattle, *M. bovis*, *M. caprae*, “*M. pinnipedii-like*” and “*M. microti-like*” isolates were found. Among *M. tuberculosis* isolates, 84 (78.5%) were classified into six families, with three prevailing genotypes (Latin–American Mediterranean (LAM), T clade and Haarlem). Concerning *M. bovis*, three spoligotype profiles (SB0120, SB0121 and SB0134) were predominant in Algeria, as in other Northern African countries. In addition, we identified some new *M. bovis* types (SB2695 to SB2701). For the first time in Algeria, *M. bovis* was found in 6% of human cases analyzed in this study. Furthermore, we documented regional variability in the prevalence of bovine TB among slaughtered cattle and in the probability of human TB being caused by *M. bovis*, suggesting the zoonotic transmission of *M. bovis*. This finding should draw the attention of Algerian health authorities to the importance of the effective control of bovine TB, including the establishment of traceability systems for livestock from the farm to slaughterhouse and between farms.

Introduction

Among infectious diseases, tuberculosis (TB) is one of the most significant in terms of public and animal health because of its high morbidity and mortality rate in humans, in addition to the economic losses related to affected herds [1,2]. The infection is caused by bacilli of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) [3], which includes 11 (sub-) species: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. orygis* and the dassie bacillus. From those, *M. tuberculosis* is the most prevalent causative agent of human pulmonary TB [4], infecting more than one-quarter of the world’s human population [5]. *M. tuberculosis* can occasionally infect animals (e.g., birds, elephants, and other mammals) that have prolonged and close contact with humans [6,7]. According to the World Health Organization (WHO), more than 10 million human TB cases were reported in 2018. The largest incidence rate of human TB occurred in the South-East Asian region, followed by the African region and the Western Pacific, with 44%, 24% and 18% of new cases, respectively [8].

M. bovis is the main causal agent of animal and bovine TB and can cause zoonotic TB in humans through ingestion (e.g., the consumption of unpasteurized milk), inhalation and—less frequently—by contact with mucous membranes and broken skin [9]. Human infection by *M. bovis* is often associated with extra-pulmonary disease [10]. Data on the prevalence of *M. bovis* in human infection are scarce but generally higher in low-income regions, with a high prevalence in cattle [11,12]. About 70,000 cases are estimated to occur annually in Africa [13].

Algeria is among the countries in which human and bovine TB are endemic. In 2018, more than 23,000 cases of human TB were reported, with a high incidence of extra-pulmonary cases (69.43%) [14]. This unexpected high level of reported extra-pulmonary TB may be linked to the applied criteria for diagnosis, which are mostly based on (para)clinical (tuberculin skin test, imaging and histopathology) rather than bacteriological findings (personal communication, National Reference Laboratory, Algiers). In general, TB laboratory diagnosis is limited to conventional tools such as microscopic examination using the Ziehl–Neelsen (ZN) technique

and sample culture on Löwenstein–Jensen (L-J) medium. Concerning bovine TB, despite the efforts made by the Algerian authority to control the disease by setting up a national screening program based on tuberculin skin testing and the elimination of all positive cattle, combined with abattoir meat inspection and the condemnation of affected carcasses, bovine TB remains prevalent (3.6%) [15,16].

Over the last few years, the development of methods for the molecular epidemiology of TB has helped to create a better understanding of this disease and its causative agent, MTBC [17]. Among these, spoligotyping is currently one of the most widespread. This simple PCR-based approach is useful for studying the phylogeography of MTBC organisms from isolates or clinical specimens. It relies on the polymorphism at one particular genomic region: the so-called direct repeat (DR) locus [18]. Polymorphisms among isolates represent the presence or absence of spacer sequences separating the direct repeats [19]. Results are represented as a binary code or an octal designation and are analyzed with web tool databases, where strains can be assigned to a specific clade and situated in a phylogenetic tree [20]. Spoligotyping has proven to be a practical and discriminatory method for large-scale studies of the epidemiology of *M. bovis* as well as for the differentiation of *M. bovis* from *M. tuberculosis* [21].

In Algeria, data on MTBC genotypes implicated in human and bovine TB are scarce or non-existent. The objectives of this study were to conduct a molecular characterization of both human and bovine MTBC in two departments of Northern Algeria using spoligotyping and to identify the potential exchange of strains with other countries as well as between cattle and humans.

Materials and methods

Ethics statement

The study protocol for human subjects was reviewed and approved by the Ethics committee of the University of Sétif (Ref. Number 015/CED/2019). Obtaining informed consent was not required for this study because individual patient data (age and sex) have been rendered and reported anonymous so that the patient is no longer identifiable. The authorization to conduct the field study in slaughterhouses (Ref. Number 449/IVW/17) was obtained from the Inspection Vétérinaire de Wilaya, operating under the auspices of the Direction des Services Vétérinaires (DSV, Ministry of Agriculture).

Study setting

The present study was conducted in two departments (wilayates) in Algeria: Béjaia is located in the North (36° 45' 00" N, 5° 04' 00" E), and Sétif, the capital of the highlands, is in North-Eastern Algeria (36° 09' 00" N, 5° 26' 00" E). According to the latest census (2018), Béjaia and Sétif have populations of 978,050 and 1,489,495 inhabitants, respectively. The departments are served by eight and seven diagnostic centers for human TB and respiratory disease control, respectively. Human samples were collected from two of these TB diagnostic centers (Service de Contrôle de la Tuberculose et des Maladies Respiratoires; SCTMR), with one each in Béjaia and Sétif.

In general, the Northern region of the country is known for its agricultural activity, including cattle breeding of different categories: local breeds (48%), cross-breeds (42%) and imported breeds (10%). Béjaia is known for its dairy cattle and goat farms, while cattle and sheep farms are concentrated in Sétif. Four municipal slaughterhouses were included in this study: Béjaia center and Kherrata from the Béjaia department, and Sétif center and El-Eulma from the Sétif department.

Samples were collected over a period of two years, from November 2017 to November 2019, with the exception of human sampling in Sétif, which was limited to a one-year period from November 2017 to December 2018.

Sample collection

The four included slaughterhouses were each visited twice a week throughout the study period. All bovine carcasses subjected to sanitary inspection that presented macroscopic lesions such as tubercles or foci with different types (caseous or calcified), single or multifocal, circumscribed or poorly delimited, were considered as TB-like lesions. All these carcasses were included in the present study, making an average of about 10 cattle per day per abattoir. Tissue samples were collected from typical tubercles or lymph nodes with TB-like lesions and stored individually in sterile, labeled containers. All collected samples were transported to the SCTMR of Béjaia and stored at -20°C for later batched bacteriological analyses. Information related to the identification of each animal (age, sex and breed) and tissue sample (organ/tissue affected and description of lesion) was recorded in our database.

For human TB, we exploited the isolates collected from the two SCTMRs located in Béjaia and Sétif. These isolates were obtained from a total of 1952 presumptive TB patients submitted to routine TB diagnostic procedures. Demographic data (age and sex) and laboratory outcomes (ZN staining, culture and type of sample) were reviewed from medical records.

Tissue preparation and bacteriological analyses

All animal tissue samples were homogenized before bacteriological examination. Approximately 5g of each specimen was cut in a sterile Petri dish using sterile blades and forceps to obtain fine pieces and further homogenized using a sterile mortar and pestle. The obtained ground tissue was decontaminated by the modified Petroff method [22]. The sediment of decontaminated samples was used for microscopic examination by ZN staining and culture by inoculation on Coletsos and L–J media. Culture tubes were incubated at 37°C for 8 to 12 weeks, with weekly observation for the growth of colonies. The presence of acid-fast bacilli (AFB) was checked by ZN staining. In accordance with routine practice, human samples underwent microscopic examination by ZN staining and culture on L–J medium.

Spoligotyping and phylogenetic analysis

For the genotyping of all isolates, a loop full of each positive culture was harvested in a sterile Eppendorf tube and suspended in 0.5 ml of sterile distilled water. All isolates were then inactivated by incubation at 100°C for 5 min in a boiling water bath and stored at -20°C until their shipment to the Institute of Tropical Medicine in Antwerp, Belgium. For each isolate, 4 μl of the denatured bacterial suspensions were used for spoligotyping following Kamerbeek's protocol [21]. The *M. tuberculosis* (H37Rv, ITM 2008-03715) and *M. bovis* BCG (ITM 1998-00269) reference strains were used as positive controls, while distilled water was used as a negative control in each run. The analysis of spoligotyping data and construction of the dendrogram were conducted by using the MIRU-VNTRplus international database (<http://www.miru-vntrplus.org>), while the designations of international names for spoligotype profiles of bovine origin were obtained from the *Mycobacterium bovis* spoligotype database (<http://www.M.bovis.org/>). For a subset of isolates that were not closely grouped to the typical *M. bovis* or *M. tuberculosis* spoligotypes, we also analyzed lineage-specific single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and the MTBC regions of difference (RDs).

PhyloSNP

The PhyloSNP analysis is based on the identification of lineage-specific SNPs [23]. We used optimized settings which differed slightly from those used by Cancino-Muñoz (S1 Text). The test consisted of two PCRs, one targeting SNPs specific for lineages 1, 2 and 5 (L1–L2–L5) and the other for L3–L4–L6, followed by Sanger sequencing (outsourced to Baseclear, The Netherlands). The sequences were aligned to the H37Rv *M. tuberculosis* reference strain using CLC sequence viewer 8 and SnapGene viewer 4.2.9 (for visualization) to identify lineage-specific SNPs as well as double peaks indicating mixed infections, if any were present.

Multiplex RD-PCR

We applied the two-step, multiplex PCR method based on genomic RDs (RD1, RD1mic, RD2seal, RD4, RD9 and RD12) for the differentiation of *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* (BCG), *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* and *M. canettii* as described by Warren and colleagues [24].

Data analysis

To calculate the p-values and odds ratio, we used MedCalc freeware (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php; accessed 06/07/2020).

Results

Clinical data of cattle samples

A total of 3546 cattle carcasses were subjected to sanitary inspection for the detection of TB-like lesions during the study period. *Post-mortem* inspection showed an overall prevalence of carcasses with TB-like lesions of 6.5% (232/3,546), with inter-region variability representing 5.4% (35/650) of cattle in Kherrata, 6.1% (150/2,460) in Béjaia and 7.3% (23/316) in El-Eulma abattoirs, which is significantly less compared to the 20% (24/120) in Sétif ($p < 0.0001$; Table 1). The distribution of lesions in organs showed that tubercles were most often (66.8%) localized in pulmonary lymph nodes, while 28.9% of cattle had lesions in both lungs and extra-pulmonary organs (liver, head, heart, abdominal and thoracic cavities, thymus, female and male genitalia, etc.) (Table 2 and Figs 1 and 2) and 4.3% of infected cattle had generalized TB (Table 2 and Fig 3).

Out of the 232 tissue samples, 73 (31.5%) were AFB-positive by direct microscopy. Further, bacterial growth was obtained for 181 samples (78%) (Fig 4), from which 64 were AFB-positive by direct smear microscopy examination. We did not observe a difference in final positivity on Coletsos versus L–J medium.

Table 1. Repartition of prevalence of bovine TB-like lesions in four abattoirs in Northern Algeria from November 2017 to November 2019.

Slaughterhouses	No. of inspected cattle	No. (%) of carcasses presenting suspected lesions of bovine TB	No. (%) of culture positive samples
Béjaia	2,460	150 (6.1)	122 (81.3)
Kherrata	650	35 (5.4)	17 (48.6)
El-Eulma	316	23 (7.3)	23 (100)
Sétif	120	24 (20) *	19 (79.2)
Total	3,546	232	181

* OR = 3.87 (95% CI 2.42–6.18); $p < 0.0001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.t001>

Table 2. Summary of repartition of bovine TB-like lesions in various organs.

Tissues/organs	No. of carcasses with lesions	
Pulmonary (LN) /Tissue	155	
Pulmonary and extra-pulmonary	Lungs + liver (LN)	27
	Lungs and/or liver + head (LN)	14
	Lungs and/or liver + mesenteric (LN)	6
	Lungs + pre-scapular or pre-crural (LN)	6
	Lungs (LN) + thoracic cavity	4
	Lungs and/or manibrial + head + liver + mesenteric (LN)	3
	Lungs and/or mesenteric + head + pre-crural + manibrial (LN)	2
	Lungs and/or testis + liver + precrural (LN)	2
	Lungs + head+ prescapular + mesenteric (LN)	1
	Lungs (LN) + heart	1
	Lungs + manibrial (LN) + thoracic cavity + thymus	1
	Generalized tuberculosis	10

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.t002>

Human samples and clinical isolates

In humans, a total of 115 cases were confirmed as being MTBC by culture (Fig 4), with 87 cases originating from the SCTMR of Béjaia (2-year sampling) and 28 from Sétif (1-year sampling). Among the 115 confirmed TB cases, 83 (72.2%) were isolated from specimens associated with pulmonary disease (51 sputum, seven bronchial aspiration fluids and 25 gastric aspirations) and 32 (27.8%) from extra-pulmonary specimens (18 pleural biopsies, one bowel biopsy, nine pleural fluids, two pus and two cerebrospinal fluid). Gastric aspirates were obtained from hospitalized adults with three smear-negative sputum specimens. Sixty-five patients were males (sex-ratio 1.3) with an age range of 18–97 years (Table 3).

Spoligotyping analysis

Spoligotyping confirmed MTBC species for all isolates, identifying a total of 181 *M. bovis*, 107 *M. tuberculosis*, three *M. caprae*, four close to the seal profile (“*M. pinnipedii-like*”) and one close to the vole profile (“*M. microti-like*”) (S1 Fig). Of the 115 human isolates, 107 were

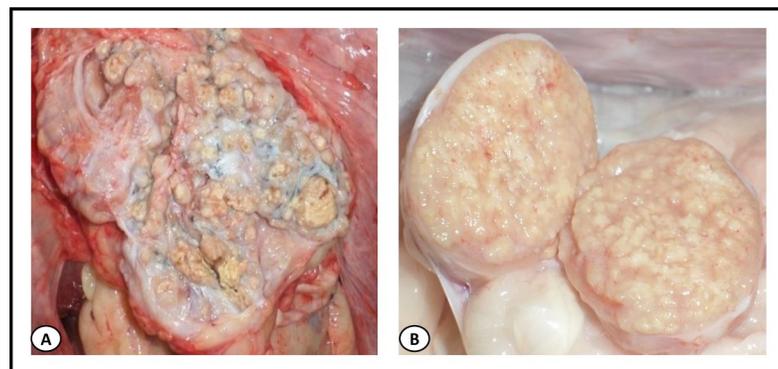


Fig 1. Granulomatous alterations of pulmonary lymph nodes. (A) Multiple small circumscribed tubercles with yellow content in the left tracheobronchial lymph node in a cow aged more than 5 years. (B) Transverse section showing several white-yellowish, irregular foci in the medial mediastinal lymph node in a calf aged <2 years.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.g001>



Fig 2. Suspected lesions of bovine tuberculosis in extra-pulmonary organs. (A) A large focus of yellow caseating necrosis in the liver tissue. (B) Numerous small, grey to white-yellowish, confluent tubercles in the uterus (miliary tuberculosis). (C) Round tuberculous granuloma containing a yellow, dry caseous necrosis central, surrounded by a thin brown zone and an outer broader, white-grey zone in the testis lymph node.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.g002>

identified as *M. tuberculosis*, seven as *M. bovis* and one “*M. pinnipedii-like*”. No *M. tuberculosis* was identified in cattle. The *M. caprae*, “*M. microti-like*” and three remaining “*M. pinnipedii-like*” isolates originated from cattle.

In total, 97 distinct spoligotype patterns were identified, with 235/296 (79.4%) of isolates being grouped into 36 clusters containing 2–61 isolates. Among the cattle isolates, a total of 42 different spoligotypes were identified, with 155/181 (85.6%) of isolates being grouped into 16 clusters containing 2–57 isolates (S1 Fig).

Overall, 264 (89.2%) isolates could be assigned to 72 different published Shared International Types (SIT) or *M. bovis* spoligotypes (SB), while 24 (8.1%) isolates could not be assigned an SIT/SB (considered “orphans”) and eight cattle isolates were assigned to seven new SB profiles (SB2695 to SB2701) (Figs S1 and 5). Two of these new profiles (SB2695 and SB2696) differed by only one spacer from previously described *M. bovis* spoligotypes (SB0134 and SB1874, respectively), while two others (SB2697 and SB2698) matched the “typical *M. bovis* profiles” despite multiple spacer differences (S1 Fig). The remaining three new profiles were more distinct (S1 Fig).

Table 3. Demographics and clinical data characteristics of TB patients.

Parameters	No. (%) of TB patients	
Sex		
Male	65 (56.5)	
Female	50 (43.5)	
Age group		
< 20 years	3 (2.6)	
21–60 years	60 (52.2)	
> 60 years	24 (20.9)	
Not recorded	28 (24.3)	
Smear microscopy		
Pulmonary form	Positive	24 (28.9)
	Negative	59 (71.1)
Extra-pulmonary form	Positive	1 (3.1)
	Negative	31 (96.9)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.t003>

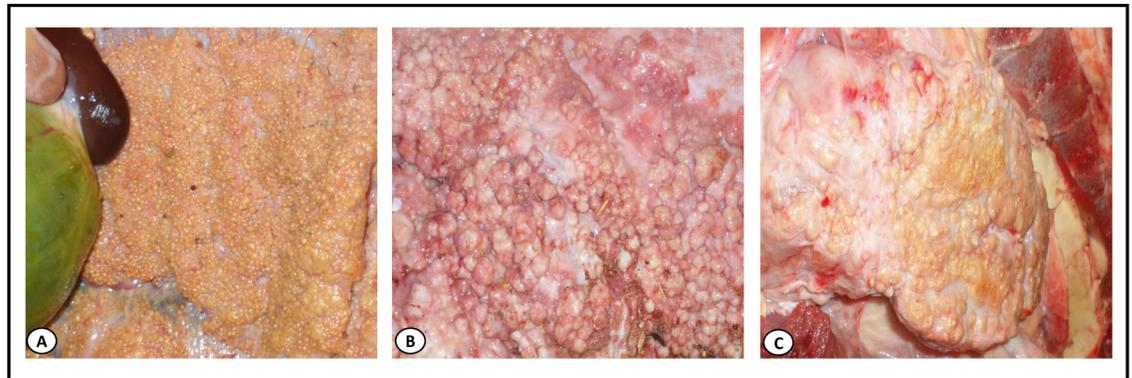


Fig 3. Generalized tuberculosis lesions in different bovine organs. (A) Small tubercles that are grey to white-yellowish on parietal pleura (miliary disease). (B) Multiple tubercles that resemble pearls of a gray-reddish color in the lung tissue (pearl disease). (C) Large caseous mass in the lung tissue.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.g003>

The SB2699 isolate from Sétif was grouped with two isolates from Béjaia showing the SB2404 profile previously described in France (S1 Fig). These three cattle isolates were most closely related to an “orphan” human isolate from Sétif and not far from the cattle isolate from

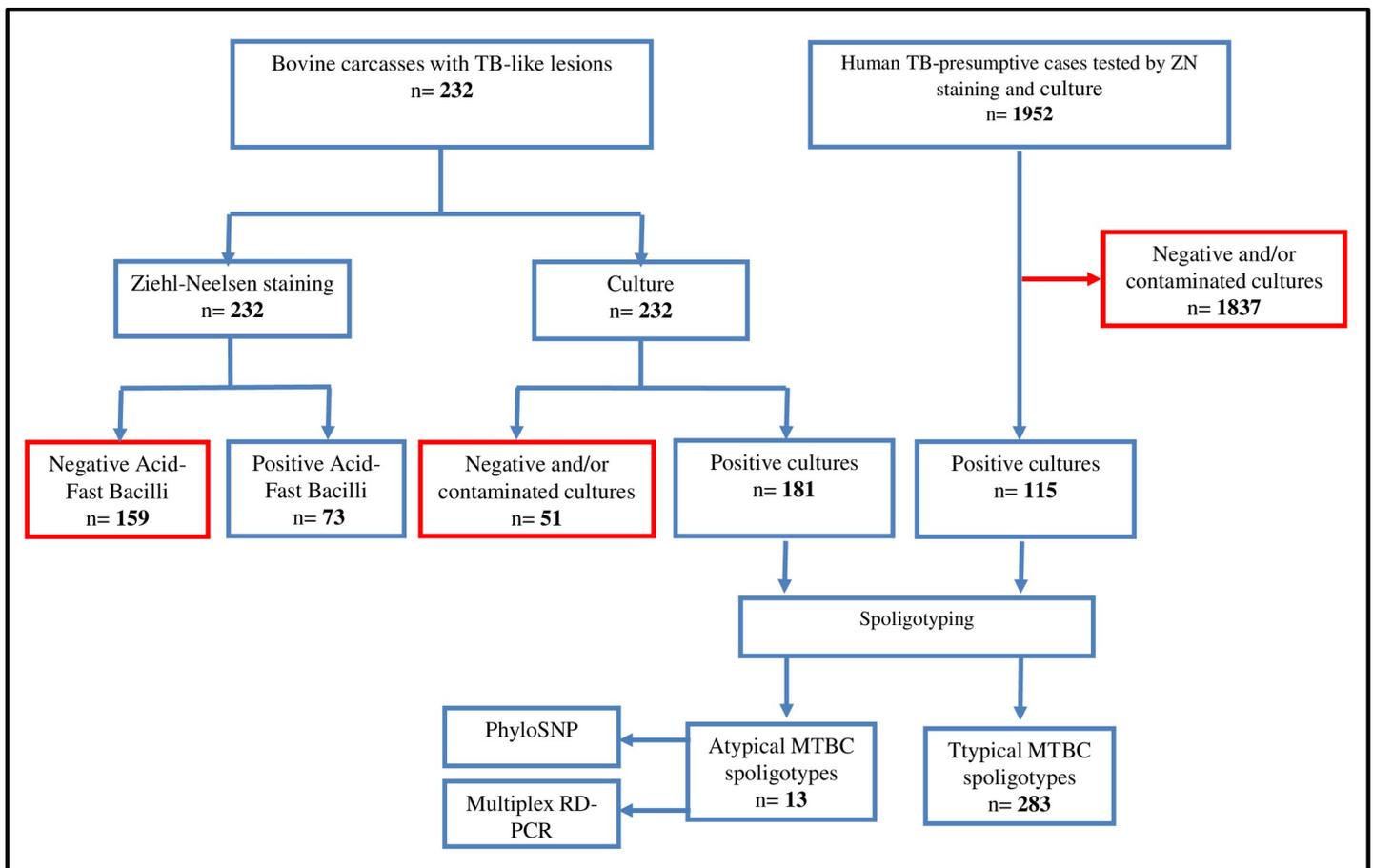


Fig 4. Schematic representation of the human and bovine sample analysis strategy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.g004>

El-Eulma with the new SB2701 profile, which in turn was closest to the “seal” profile (*M. pinnipedii*). The SB2701 strain was isolated from an adult (three-years-old) male bovine with milinary TB (S2 Fig). RD-PCR analysis showed the typical “*M. bovis*” RDs profile with an absence of RD4, RD9 and RD12 for SB2699 and SB2404, although an uninterpretable result was found for RD4 in the case of the SB2701 isolate. PhyloSNP analysis did not detect any of the SNPs specific for *M. tuberculosis* lineages L1 to L6 for any of these isolates. Despite the suggested close link to the “seal” profile based on spoligotyping, the SB2701 isolate exhibited an RD2seal band, which is typically missing from *M. pinnipedii*.

The last new profile (SB2700) most closely matched the “vole” profile (*M. microti*) (S1 Fig). It was isolated from the caseous-calcified lesion of the right tracheobronchial lymph node of an adult (two-year-old) male bovine (S2 Fig). Despite the suggested close link to the “vole” profile based on spoligotyping, the SB2700 isolate exhibited the RD1mic band, which is typically missing from *M. microti*. RD9 and RD12 were missing, suggesting classification as *M. bovis*, but no band was obtained with the RD4 primers, which is not in agreement with the *M. bovis* classification. PhyloSNP analysis did not detect any of the SNPs specific for *M. tuberculosis* lineages L1 to L6.

Twenty-eight of the spoligotypes from bovine origin, representing 23.7% (43/181) of our cattle isolates, were not yet reported in Algeria (S1 Table). With the exception of five existing SB types and the seven new SB types, all SB types have been reported before in neighboring Northern African or Southern European countries (S1 Table). Most of the isolates belonging to SB types previously reported in Algeria were part of a cluster in this study (S1 Table). The highest frequency was recorded for SB0120 ($n = 57$, 31.5%) followed by SB0121 ($n = 41$, 22.6%) and SB0134 ($n = 18$, 9.9%). The three *M. caprae* isolates belonged to SB0835 (two isolates; one from Béjaia and one from Sétif) and SB1451 (one isolate from Sétif) spoligotypes.

The human *M. bovis* isolates ($n = 7$) were assigned to four different spoligotypes, of which six were grouped with bovine isolates (SB0120, SB0121, SB0860), while one isolate (SB2521) did not match any of our cattle isolates (S1 Table and Fig 5). It is worthy of note that SB2521 differs in only one spacer from the more common SB0134. The proportion of *M. bovis* isolation from patients with extra-pulmonary TB (2/32, 6.2%) did not differ from that in pulmonary TB patients (5/83, 6%) ($p = 0.9638$; S2 Table). *M. bovis* represented 14.3% (4/28) of human MTBC isolates from Sétif and 3.4% (3/87) of Béjaia human isolates ($p = 0.0536$; S2 Table).

M. tuberculosis isolates were classified into six families including Latin–American Mediterranean (LAM, $n = 31$, 29%), T ($n = 23$, 21.5%), Haarlem (H, $n = 21$, 19.6%), Ural (U, $n = 6$, 5.6%), S ($n = 2$, 1.9%) and USA ($n = 1$, 0.9%). The most prevalent spoligotype patterns were SIT 42/LAM 9 ($n = 14$, 13.1%), SIT 53/T1 ($n = 8$, 7.5%), and SIT 1800/T1 and SIT 50/H3, each with six isolates (5.6%).

Discussion

The present study describes the genetic diversity of MTBC strains in humans and cattle from Northern Algeria. Regarding bovine TB, the *post-mortem* macroscopic inspection of bovine carcasses slaughtered in the four investigated abattoirs revealed a high prevalence (6.5%) of TB-like lesions compared to previously reported data from Algeria (3.6% in 2007) [15,16]. This value is also higher than the values reported in the neighboring countries, such as Morocco (3.7%) and Tunisia (3.2%) [25,26]; however, it is lower than the values reported in other African countries, such as Nigeria (9.3%) and Mali (11.9%) [27,28]. This variation might be explained by numerous parameters which are considered to be risk factors for bovine TB, such as age, gender, breed, immune status, etc. [29].

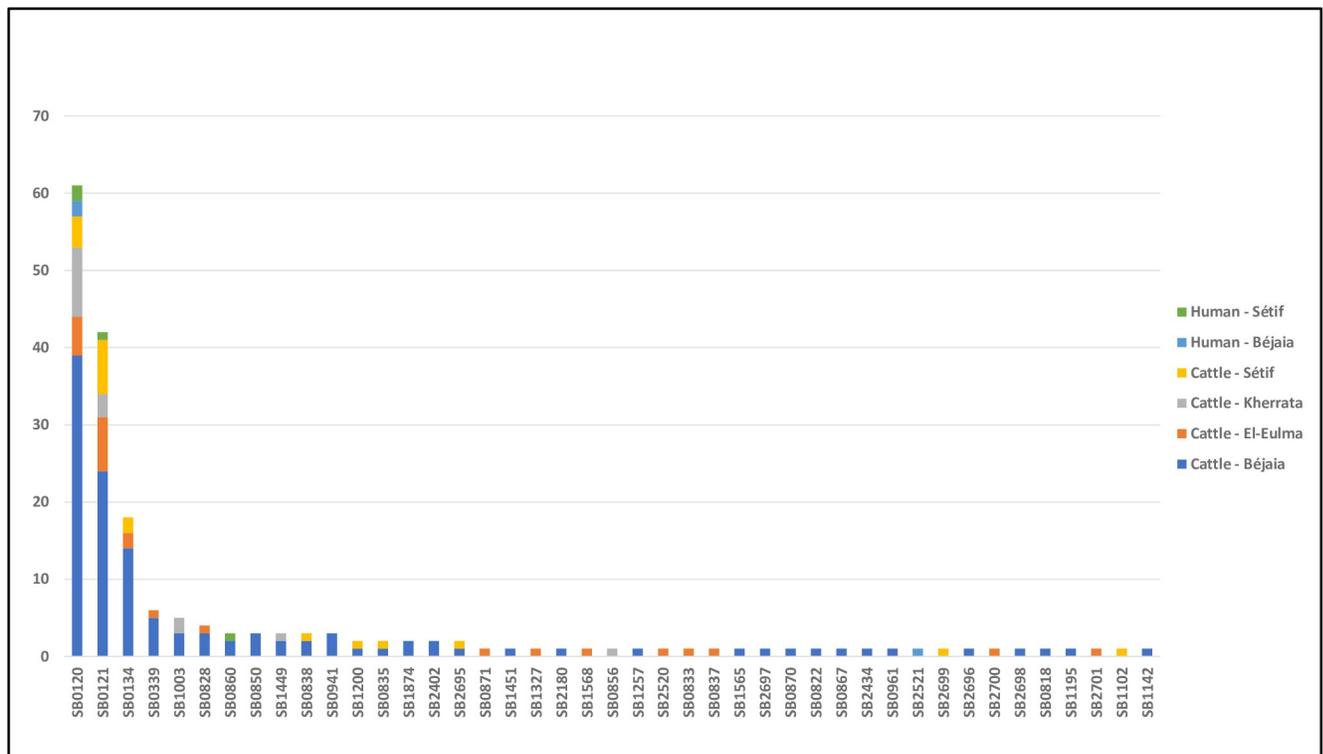


Fig 5. Distribution of *M. bovis* spoligotypes among bovine and human samples from two departments in Algeria (2017–2019).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008894.g005>

In the present study, we observed TB-like lesions in different organs including pulmonary and extra-pulmonary tissues. Nevertheless, over 95% (222/232) of noted lesions occurred in the lung tissue and/or lymph nodes. Among these, 30.2% were associated with extra-pulmonary organs and two-thirds (69.8%) were confined to the lungs, corroborating previous studies reporting that bovine TB mostly affects the lungs [25,27,30–32] as a result of the primary transmission route [33]. A minority of inspected carcasses (4.3%) presented generalized TB lesions. Generalized disease may occur if the initial immune response is ineffective or after reinfection [33].

In our study, 78% of bovine tissue samples submitted to culture were positive. It is worthy of note that although culture is considered to be the “gold standard” in TB diagnosis, its sensitivity is low and leaves much room for improvement [34]. In fact, its sensitivity varies according to the decontamination method and/or storage conditions of the samples [35]. In our study, due to logistic constraints, bovine samples were stored at -20°C for a maximum of five weeks prior culture processing, which may interfere with the viability of mycobacteria.

Based on spoligotyping, all cattle isolates were confirmed as MTBC, including *M. bovis*, *M. caprae*, *M. “microti-like”* and *M. “pinnipedii-like”*, all of which are known for their potential contribution to zoonotic TB [13,36,37]. Interestingly, no isolates were attributed to non-tuberculous mycobacteria (NTM) species, which are often a cause of pulmonary diseases in cattle that resemble TB. The likely implication of NTM species in bovine TB was reported in Algeria with a proportion of 3% [15], as well as in numerous neighboring countries, such as Tunisia (3%), Mali (10.1%) and Niger (38.5%) [28,30,38].

The most abundant *M. bovis* spoligotypes observed in our study (SB0120, SB0121 and SB0134) are among the most common worldwide. SB0120 and SB0121 are the predominant *M. bovis* profiles circulating among animals including cattle, especially in Africa and

continental European countries [39]. These two profiles are prevalent in Northern Africa, including in Algeria, Tunisia and Morocco, as well as in France, Spain, Italy, Portugal and Belgium [15,25,38,40–42]. The SB0134 spoligotype is frequently reported in Africa—for instance, in Algeria (7%), Tunisia (11.4%) and Mali (15%) [15,38,43]—and seems to be prevalent in France and Spain [40,41]. The importation of dairy cattle from Europe to North Africa, including Algeria—still common practice as of today—could explain the spread of these profiles. This hypothesis is consolidated by the phylogenetic link between *M. bovis* isolates from Algeria and France as reported by Sahraoui et al. [15]. Based on whole genome sequence analysis in a recent study comprising isolates from various geographical origins, SB0120 isolates were assigned to some new “unknown” clonal complexes (unknown 2, 3, 4 or 5), while all SB0121 isolates from the same study were grouped as belonging to the European 2 complex [44]. Some East-African SB0134 isolates were recently classified as part of the “unknown 2” clonal complex, while two European SB0134 were grouped under “unknown 7”. Among the less frequently known SB types, one was assigned to EU2 (SB0339, Germany), one as “unknown 2” (SB1003, unknown geographical origin), and some were grouped under “unknown 4” (SB0870 from Germany, SB0833, SB0860, SB0871 and SB0961 from unknown geographical origin) [44].

Regarding *M. caprae*, we identified two types (SB0835 and SB1451) from cattle in two slaughterhouses. *M. caprae* was previously isolated from bovine TB in Algeria and other African countries [25,26,38,45]. The infection of cattle by *M. caprae* could be explained by the cohabitation with goats [15]. In fact, the sharing of watering and grazing points between goats and cattle allows a close interspecies interaction among these domestic animals and therefore increases the likelihood of the cross-species transmission of mycobacteria [46–49].

It is particularly noteworthy that we identified seven new profiles from cattle, of which three presented with “atypical” profiles: SB2699 from the Sétif slaughterhouse grouping with SB2402, and from the El-Eulma slaughterhouse, profiles SB2700 and SB2701, which were closely grouped to *M. microti* and *M. pinnipedii*, respectively. Even though these were closely grouped by spoligotyping, our RD-PCR analysis could not confirm this “subspecies” identification. *M. microti* and *M. pinnipedii* have not been reported among cattle with TB-like lesions in Algeria to date. *M. microti* was originally identified as the cause of TB in wild rodents [50,51], but it can also infect other animals. It has been reported occasionally in cattle from France and South Africa [52,53]. *M. microti* can be transmitted directly from rodents to humans by domestic hosts such as cats, llamas, dogs or cattle [36,51]. *M. pinnipedii* causes TB in a number of pinniped species (marine mammals) worldwide [54]. Pinnipeds infected with *M. pinnipedii* in marine parks and zoos are the main source of infection for humans and other animals [54,55]. In New Zealand, the infection of cattle with *M. pinnipedii* was associated with contaminated water derived directly from the ocean or beach grazing areas where pinnipeds were found [56]. It remains unclear what the source of infection could be for these unusual MTBC strains in our area. Furthermore, additional genetic (whole genome sequencing) analysis is needed to further characterize these strains, as spoligotyping has limited discriminatory capacity, phylogenetic distances cannot be reliably determined [57] and the RD-PCR applied in this study targets only a limited number of RDs, not all of which are relevant for *M. bovis* typing [24,44].

Concerning human TB, we identified seven isolates as *M. bovis*. This is the first report of *M. bovis* from humans in Algeria. Infection with *M. bovis* in humans appears to occur mostly in developing countries, especially in Africa [58–63]. Most of our isolates were identified from pulmonary specimens, reflecting airway infection. This form of zoonotic TB occurs usually among people who have frequent contact with infected animals, such as farmers and veterinarians [64]. As for the extra-pulmonary forms, generally, the infection occurs by the consumption of unpasteurized dairy products from infected cows [65]. Dürr et al. [10] have suggested

an association between zoonotic TB and extra-pulmonary infection, with predominant infections of the lymph nodes. In their study, Ghariani et al. [62] reported the occurrence of *M. bovis* in 76% of lymphadenitis cases. In the present investigation, patients with lymphadenitis TB were not included because the diagnostic of this form is only performed by the histopathological examination of lymph node biopsies. This therefore constitutes a bias when estimating the real implication of *M. bovis* in human cases. Another cause of the underestimation of *M. bovis* in human TB from our study may have been the fact that human samples were only grown on L–J medium, which contains glycerol, which partially inhibits the growth of *M. bovis* [66]. Nevertheless, in our study, *M. bovis* isolated from bovine tissues grew well on L–J medium, and so the culture medium bias for human samples may also have been limited.

As regards the zoonotic transmission of bovine TB in Northern Algeria, our data allow us to suggest a regional, causal link between bovine and human TB, similar to the previously reported positive correlations between the prevalence of bovine TB and human infection with *M. bovis* [11,12]. We observed a significantly higher prevalence of bovine carcasses with TB-like lesions in Sétif's slaughterhouse (20%) as compared to the other slaughterhouses; on the other hand, being diagnosed at the Sétif hospital tended towards an association with *M. bovis* infection but did not reach significance. In addition, regarding bovine isolates, SB0120 was the most prevalent among human *M. bovis* isolates, while SB0121 and SB0860 were also identified. The observed higher bovine TB among cattle from Sétif might be linked to a difference in cattle population across the included slaughterhouses, with 40% of elderly females in Sétif compared to <1% in Béjaia. A more in-depth multivariate analysis including all risk factors is needed to further investigate this, which was beyond the scope of the current study. Furthermore, to document real chains of transmission, more in-depth genetic and epidemiological analysis over a longer period would be needed. In the current study, we did not have access to the socio-demographic data of patients (e.g., profession, consumer habits and HIV status) to assess the influence of these factors on human infection, especially on the zoonotic TB forms. Additionally, in current routine practice, details regarding the origin of animals are not registered in Algerian slaughterhouses, jeopardizing this investigation.

Our results demonstrated that majority of the 107 *M. tuberculosis* strains belonged to lineage 4—the most widespread lineage and among the more virulent globally [67]. The predominant clades identified in this lineage were LAM (29%), T (21.5%) and Haarlem (19.6%), which were reported in Algeria and in Northern African countries as large common clades [68]. The most prevalent sub-lineage LAM 9 (SIT 42, 13.1%) is predominant in North Africa as well as in a number European countries such as Spain, Italy and Belgium, sharing a close cluster with Northern Africa countries [69]. SIT 42 was previously reported in human TB in Algeria (19.3%) [70] and Morocco (24%) [71]. The second-most prevalent sub-lineage T1 (SIT 53, 7.5% and SIT 1800, 5.6%) is prevalent in 70% of African countries as well as in some European countries (France, Italy and Belgium) [69]. This sub-lineage seems to be implicated with a higher likelihood of antibiotic-resistance compared to other genotypes [72]. We do not have drug-susceptibility data for our isolates. While SIT 53 was previously reported in Algeria (25.3%) [70] and in other Africa countries such as Morocco (11.1%) [71], our study reports the presence of SIT 1800 in Algeria for the first time. The SIT 50/H 3 sub-lineage is typically implicated in human TB in African countries, such as in Algeria (19.3%) [70] and Morocco (5.3%) [71].

Conclusion

The identification of a zoonotic mosaic MBTC species belonging to different geographical origins (Africa, Europe and Asia) would be of particular interest from the perspective of the

current re-emergence/emergence of multidrug-resistant strains in Algeria. The possible implication of *M. bovis* in human TB in Northern Algeria cannot be ignored, since 7 out of 115 confirmed cases were due to this zoonotic species. We therefore conclude that a collaboration between the Ministry of Health and the Directorate of Veterinary Services in this country is crucial to further expand our understanding of *M. bovis* infection prevalence in cattle and its risks for human health. Furthermore, the establishment of traceability systems for livestock from the farm to slaughterhouse is an urgent necessity. This kind of device would allow the generation of data and relevant information on the life of an animal since birth until the end of its life to be collected. Thus, traceability systems would limit the spread of infectious agents (e.g., *M. bovis*, *Brucella* spp., etc.) in the herd as well as from animals to humans by acting upstream.

Supporting information

S1 Fig. Phylogenetic tree of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) genotypes (n = 97 spoligotype patterns) from humans and cattle in two departments of Northern Algeria (2017–2019), using the MIRU-VNTR_{plus} international database ().
(TIF)

S2 Fig. Tuberculosis lesions associated with *M. “microti-like”* and *M. “pinnipedii-like”* infection in cattle. (A) Caseous-calcified lesion of the right tracheobronchial lymph node by *M. “microti-like”* (SB2700), miliary TB infection by *M. “pinnipedii-like”* (SB2699) in lungs and liver (B), diaphragm (C), digestive tract (D) and spleen (E).
(TIF)

S1 Table. Overview of 43 *Mycobacterium bovis* and related spoligotypes identified in human and bovine samples in the present study, stratified according to previous reporting in Algeria or neighboring North African and South European countries.
(DOCX)

S2 Table. The distribution of human MTBC species did not differ significantly according to the disease presentation or hospital district.
(DOCX)

S1 Text. Protocol: Lineage-specific single-nucleotide polymorphisms (SNPs) used in this study for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates.
(PDF)

Acknowledgments

The authors thank all the physicians and veterinarians who participated in the sample collections, and Bouke C. de Jong from the Institute of Tropical Medicine, Antwerp (Belgium) for her precious help in the success of the study.

Author Contributions

Conceptualization: Hanane Damene, Naima Sahraoui.

Data curation: Hanane Damene, Maren Diels, Leen Rigouts.

Formal analysis: Hanane Damene, Djamel Tahir, Maren Diels, Leen Rigouts.

Investigation: Hanane Damene.

Methodology: Hanane Damene, Leen Rigouts.

Project administration: Ali Berber, Naima Sahraoui.

Resources: Naima Sahraoui, Leen Rigouts.

Software: Leen Rigouts.

Supervision: Naima Sahraoui, Leen Rigouts.

Validation: Djamel Tahir, Leen Rigouts.

Visualization: Leen Rigouts.

Writing – original draft: Hanane Damene, Djamel Tahir.

Writing – review & editing: Hanane Damene, Djamel Tahir, Maren Diels, Ali Berber, Naima Sahraoui, Leen Rigouts.

References

1. LoBue PA, Enarson DA, Thoen CO. Tuberculosis in humans and animals: an overview. The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2010; 14:1075–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819249> PMID: 20819249
2. Caminiti A, Pelone F, Battisti S, Gamberale F, Colafrancesco R, Sala M, et al. Tuberculosis, Brucellosis and Leucosis in Cattle: A Cost Description of Eradication Programmes in the Region of Lazio, Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2017; 64:1493–1504. <https://doi.org/10.1111/tbed.12540> PMID: 27390169
3. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics*. 2013; 45:1176–1182. <https://doi.org/10.1038/ng.2744> PMID: 23995134
4. Velayati AA, Farnia P. Atlas of *Mycobacterium Tuberculosis*. Elsevier;2017. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00386-0>
5. Houben RMGJ, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS medicine*. 2016; 13:e1002152. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152> PMID: 27780211
6. Saunders G. Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in a circus elephant. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1983; 183:1311–2. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6417092> PMID: 6417092
7. Michalak K. *Mycobacterium tuberculosis* infection as a Zoonotic Disease: Transmission between Humans and Elephants. *Emerging Infectious Diseases*. 1998; 4:283–287. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980217> PMID: 9621200
8. World Health Organization (WHO). Tuberculosis. [cited 12 Dec 2019]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
9. de la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. 2006; 86: 77–109. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002> PMID: 16257579
10. Dürr S, Müller B, Alonso S, Hattendorf J, Laise CJM, van Helden PD, et al. Differences in Primary Sites of Infection between Zoonotic and Human Tuberculosis: Results from a Worldwide Systematic Review. Phillips RO, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013; 7:e2399. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002399> PMID: 24009789
11. Ljungh A, American P. Zoonotic Tuberculosis in Latin America *Bordetella pertussis* versus Non-*L. pneumophila Legionella* a Continuing Diagnostic Challenge. 1992; 30:3299–3300. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270657/>
12. Pérez-Lago L, Navarro Y, García-de-Viedma D. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Research in Veterinary Science*. 2014; 97:S94–S100. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.008> PMID: 24360647
13. Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laise CJM, Parsons SDC, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging infectious diseases*. 2013; 19: 899–908. <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543> PMID: 23735540

14. Institut National de Santé Publique. Journée mondiale de la lutte contre la tuberculose. 2019 [cited 19 Dec 2019]. Available: <http://www.insp.dz/index.php/informations/journee-mondiale-tuberculose-insp.html>
15. Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. BMC Veterinary Research. 2009; 54. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-4> PMID: 19173726
16. Sahraoui N, Muller B, Djamel Y, Fadéla B, Rachid O, Jakob Z, et al. Evaluation des VNTR (variable number of tandem repeats) des isolats de *Mycobacterium bovis* en Algérie. Annales de biologie clinique. 2010; 68:449–453. <https://doi.org/10.1684/abc.2010.0459> PMID: 20650740
17. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. Clinical Microbiology Reviews. 2006; 19:658–685. <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-05> PMID: 17041139
18. Hermans PWM, Van Soolingen D, Bik EM, De Haas PEW, Dale JW, Van Embden JDA. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infection and Immunity. 1991; 59:2695–2705. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.8.2695-2705.1991> PMID: 1649798
19. Ramos DF, Tavares L, da Silva PEA, Dellagostin OA. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: A review. Brazilian Journal of Microbiology. 2014; 45:365–372. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014005000045> PMID: 25242917
20. De La Salmonière YOG, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, Van Embden J, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. 1997; 35:2210–2214. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.9.2210-2214.1997> PMID: 9276389
21. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology. 1997; 35:907–914. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.4.907-914.1997> PMID: 9157152
22. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia: U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; 1985.
23. Cancino-Muñoz I, Gil-Brusola A, Torres-Puente M, Mariner-Licer C, Dogba J, Akinseye V, et al. Development and application of affordable SNP typing approaches to genotype *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in low and high burden countries. Scientific Reports. 2019; 9:15343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51326-2> PMID: 31653874
24. Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesselting A, Engelke E, de Kock M, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2006; 10:818–22. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16850559> PMID: 16850559
25. Yahyaoui-Azami H, Aboukassab H, Bouslikhane M, Berrada J, Rami S, Reinhard M, et al. Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco. BMC Veterinary Research. 2017; 13:272. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1165-6> PMID: 28841870
26. Lamine-Khemiri H, Martínez R, García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Cortés M, Hurtado I, et al. Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle of Tunisia. Tropical Animal Health and Production. 2014; 46:305–311. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0488-y> PMID: 24158359
27. Ejeh EF, Raji MA, Bello M, Lawan FA, Francis MI, Kudi AC, et al. Prevalence and Direct Economic Losses from Bovine Tuberculosis in Makurdi, Nigeria. Veterinary Medicine International. 2014; 2014:1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/904861> PMID: 24987543
28. Diallo M, Diarra B, Sanogo M, Togo ACG, Somboro AM, Diallo MH, et al. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* from cattle and human host in Mali: expanded genetic diversity. BMC veterinary research. 2016; 12:145. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0768-7> PMID: 27439708
29. Humblet M-F, Boschiroli ML, Saegerman C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. Veterinary research. 40:50. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009033> PMID: 19497258
30. Boukary AR, Thys E, Rigouts L, Matthys F, Berkvens D, Mahamadou I, et al. Risk Factors Associated with Bovine Tuberculosis and Molecular Characterization of *Mycobacterium bovis* Strains in Urban Settings in Niger. Transboundary and Emerging Diseases. 2012; 59:490–502. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01302.x> PMID: 22226088
31. Sa'ïdu AS, Okolocha EC, Dzikwi AA, Kwaga JKP, Gamawa AA, Usman A, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in Organs of Slaughtered Cattle by DNA-Based Polymerase Chain Reaction and Ziehl-

- Neelsen Techniques in Bauchi State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine*. 2015; 2015:1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/921868> PMID: 26464955
32. Ahmad I, Kudi CA, Abdulkadir AI, Saidu SNA. 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*. 2017; 49:583–589. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1232-9> PMID: 28188412
 33. Domingo M, Vidal E, Marco A. Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*. 2014; 97:S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017> PMID: 24731532
 34. D'Amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, Colaninno PM, Scardamaglia M, Ardila E, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33:1832–1834. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.7.1832-1834.1995.203> PMID: 7665654
 35. Palomino JC, Portaels F. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36:402–408. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.402-408.1998> PMID: 9466749
 36. Van Sooling D, Van Der Zanden AGM, De Haas PEW, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraïne NA, et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36:1840–1845. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.7.1840-1845.1998> PMID: 9650922
 37. Cousins D V., Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003; 53:1305–1314. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02401-0> PMID: 13130011
 38. Djemal SE, Siala M, Smaoui S, Kammoun S, Marouane C, Bezos J, et al. Genetic diversity assessment of Tunisian *Mycobacterium bovis* population isolated from cattle. *BMC Veterinary Research*. 2017; 13:393. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1314-y> PMID: 29246228
 39. Ghavidel M, Mansury D, Nourian K, Ghazvini K. The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; A systematic review. *Microbial Pathogenesis*. 2018; 118:310–315. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.036> PMID: 29578066
 40. Hauer A, De Cruz K, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henault S, et al. Genetic Evolution of *Mycobacterium bovis* Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978. Langsley G, editor. *PLOS ONE*. 2015; 10:e0117103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117103> PMID: 25658691
 41. Rodríguez S, Romero B, Bezos J, de Juan L, Álvarez J, Castellanos E, et al. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary Microbiology*. 2010; 141:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.007> PMID: 19720476
 42. Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science*. 2004; 76:1–18. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(03\)00078-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(03)00078-x) PMID: 14659724
 43. Müller B, Steiner B, Bonfoh B, Fané A, Smith NH, Zinsstag J. Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC Veterinary Research*. 2008; 4:26. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-26> PMID: 18637160
 44. Loiseau C, Menardo F, Aseffa A, Hailu E, Gumi B, Ameni G, et al. An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evolution, Medicine, and Public Health*. 2020; 2020:49–59. <https://doi.org/10.1093/emph/eoaa005> PMID: 32211193
 45. Ahmad I, Kudi CA, Abdulkadir AI, Saidu SNA, Chafe UM, Abdulmalik Z. Survey of bovine tuberculosis in Nigerian beef cattle. *Open Veterinary Journal*. 2019; 8:463. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i4.18> PMID: 30775286
 46. Gumi B, Schelling E, Firdessa R, Erenso G, Biffa D, Aseffa A, et al. Low prevalence of bovine tuberculosis in Somali pastoral livestock, southeast Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 2012; 44:1445–1450. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0085-5> PMID: 22286399
 47. Tschopp R, Aseffa A, Schelling E, Berg S, Hailu E, Gadisa E, et al. Bovine Tuberculosis at the Wildlife-Livestock-Human Interface in Hamer Woreda, South Omo, Southern Ethiopia. Pai M, editor. *PLoS ONE*. 2010; 5:e12205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012205> PMID: 20808913
 48. Muñoz Mendoza M, Juan L de, Menéndez S, Ocampo A, Mourel J, Sáez JL, et al. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in sheep. *The Veterinary Journal*. 2012; 191:267–269. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.05.006> PMID: 21703887
 49. Mamo G, Bayleyegn G, Sisay Tessema T, Legesse M, Medhin G, Bjune G, et al. Pathology of Camel Tuberculosis and Molecular Characterization of Its Causative Agents in Pastoral Regions of Ethiopia.

- Ahmed N, editor. PLoS ONE. 2011; 6:e15862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015862> PMID: 21283668
50. Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34:933–938. <https://doi.org/10.1128/JCM.34.4.933-938.1996> PMID: 8815111
 51. Panteix G, Gutierrez MC, Boschirolu ML, Rouviere M, Plaidy A, Pressac D, et al. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *Journal of Medical Microbiology*. 2010; 59:984–989. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.019372-0> PMID: 20488936
 52. Anonymous. *Mycobacterium microti* infection in a cow in France. *Veterinary Record*. 2017; 180:429.1–429. <https://doi.org/10.1136/vr.j2041> PMID: 28450491
 53. Bhembe NL, Tanih GN, Caine L-A, Pekana A, Govender P, Nwodo UU, et al. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Cattle Lymph Nodes in Eastern Cape Province. *BioMed Research International*. 2018; 2018:1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/3683801> PMID: 29850506
 54. Silva-Pereira TT, Ikuta CY, Zimpel CK, Camargo NCS, de Souza Filho AF, Ferreira Neto JS, et al. Genome sequencing of *Mycobacterium pinnipedii* strains: genetic characterization and evidence of superinfection in a South American sea lion (*Otaria flavescens*). *BMC Genomics*. 2019; 20:1030. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6407-5> PMID: 31888476
 55. Roe WD, Lenting B, Kokosinska A, Hunter S, Duignan PJ, Gartrell B, et al. Pathology and molecular epidemiology of *Mycobacterium pinnipedii* tuberculosis in native New Zealand marine mammals. *PloS one*. 2019; 14: e0212363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212363> PMID: 30753243
 56. Loeffler SH, de Lisle GW, Neill MA, Collins DM, Price-Carter M, Paterson B, et al. The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: epidemiologic factors and DNA strain typing. *Journal of wildlife diseases*. 2014; 50:180–7. <https://doi.org/10.7589/2013-09-237> PMID: 24484478
 57. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PloS one*. 2009; 4:e7815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007815> PMID: 19915672
 58. Mawak J., Gomwalk N., Bello CS., Kandakai-olukemi Y. Human pulmonary infections with bovine and environment (atypical) *Mycobacteria* in Jos, Nigeria. *Ghana Medical Journal*. 2010; 40. <https://doi.org/10.4314/gmj.v40i3.55268> PMID: 17496986
 59. Kazwala RR, Daborn CJ, Sharp JM, Kambarage DM, Jiwa SFH, Mbembati NA. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern? 2001; 5:87–91. PMID: 11263522
 60. Kidane D, Olobo JO, Habte A, Negesse Y, Aseffa A, Abate G, et al. Identification of the Causative Organism of Tuberculous Lymphadenitis in Ethiopia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40:4230–4234. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.11.4230-4234.2002> PMID: 12409403
 61. Malama S, Johansen TB, Muma JB, Munyeme M, Mbulo G, Muwonge A, et al. Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. *Veterinary Medicine International*. 2014; 2014: 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/187842> PMID: 24847441
 62. Ghariani A, Jaouadi T, Smaoui S, Mehiri E, Marouane C, Kammoun S, et al. Diagnosis of lymph node tuberculosis using the GeneXpert MTB/RIF in Tunisia. *International Journal of Mycobacteriology*. 2015; 4:270–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.05.011> PMID: 26964807
 63. Siala M, Cassan C, Smaoui S, Kammoun S, Marouane C, Godreuil S, et al. A first insight into genetic diversity of *Mycobacterium bovis* isolated from extrapulmonary tuberculosis patients in South Tunisia assessed by spoligotyping and MIRU VNTR. Foley J, editor. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019; 13:e0007707. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007707> PMID: 31532767
 64. Vayr F, Martin-Blondel G, Savall F, Soulat J-M, Deffontaines G, Herin F. Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic review. *PLOS neglected tropical diseases*. 2018; 12:e0006208. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006208> PMID: 29337996
 65. Fox GJ, Barry SE, Britton WJ, Marks GB. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 2013; 41:140–156. <https://doi.org/10.1183/09031936.00070812> PMID: 22936710
 66. Garnier T, Eiglmeier K, Camus J-C, Medina N, Mansoor H, Pryor M, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100:7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100> PMID: 12788972
 67. Senghore M, Diarra B, Gehre F, Otu J, Worwui A, Muhammad AK, et al. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages and their role in an emerging threat of multidrug resistant tuberculosis in Bamako, Mali. *Scientific Reports*. 2020; 10:327. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56001-0> PMID: 31941887

68. Mekonnen D, Derbie A, Abeje A, Shumet A, Kassahun Y, Nibret E, et al. Genomic diversity and transmission dynamics of *M. tuberculosis* in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2019; 23:1314–1326. <https://doi.org/10.5588/ijtld.19.0127> PMID: 31931916
69. Chihota VN, Niehaus A, Streicher EM, Wang X, Sampson SL, Mason P, et al. Geospatial distribution of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Africa. *Arez AP*, editor. *PLOS ONE*. 2018; 13:e0200632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200632> PMID: 30067763
70. Ifticene M, Kaïdi S, Khechiba M-M, Yala D, Boulahbal F. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Algeria: Results of spoligotyping. *International Journal of Mycobacteriology*. 2015; 4:290–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.06.004> PMID: 26964810
71. Chaoui I, Zozio T, Lahlou O, Sabouni R, Abid M, El Aouad R, et al. Contribution of spoligotyping and MIRU-VNTRs to characterize prevalent *Mycobacterium tuberculosis* genotypes infecting tuberculosis patients in Morocco. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014; 21:463–471. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.023> PMID: 23732366
72. Togo AG, Kodio O, Diarra B, Sanogo M, Coulibaly G, Bane S, et al. The most frequent *Mycobacterium tuberculosis* complex families in mali (2006–2016) based on spoligotyping. *International Journal of Mycobacteriology*. 2017; 6:379. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_140_17 PMID: 29171452

UNIVERSITE BLIDA 1

Institut des sciences vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

en sciences vétérinaires

Spécialité : Microbiologie médicale des maladies zoonotiques

CARACTERISATION DES MYCOBACTERIES RESPONSABLES DE LA
TUBERCULOSE RESPIRATOIRE ET GENITALE CHEZ L'HOMME ET LES
BOVINS DANS LA REGION CENTRE DE L'ALGERIE

Par

Hanane DAMENE

Devant le jury composé de :

R. KAIDI	Professeur, ISV de Blida-1	Président
M. HAMIROUNE	MCA, Université de Djelfa	Examineur
L. BOUAYAD	MCA, ENSV Alger	Examinatrice
R. BAAZIZI	MCA, ENSV Alger	Examinatrice
N. SAHRAOUI	Professeur, ISV de Blida-1	Directrice de thèse
A. BERBER	Professeur, ISV de Blida-1	Co-directeur de thèse

Blida, Janvier 2021

RESUME

La tuberculose (TB) est une maladie importante chez les animaux et l'homme dans le monde. Le génotypage est très utile pour comprendre l'épidémiologie de la TB. En Algérie, les données sur l'épidémiologie de ces infections et les génotypes du complexe *M. tuberculosis* (CMT) sont en grande partie inconnues. Dans ce contexte, nous avons mené une étude sur la diversité génétique des souches du CMT isolées chez l'homme et les bovins dans deux provinces de la région Centre de l'Algérie à l'aide d'outils moléculaires.

Au total, 296 souches du CMT ont été isolées à partir de 181 échantillons de tissus présentant des lésions suspectes de TB bovine et 115 de cas de TB humaine. Tous les isolats ont été génotypés par spoligotypage. L'identification des espèces a montré la présence de 107 *M. tuberculosis*, 07 *M. bovis* et un "*M. pinnipedii*" chez l'homme et 174 isolats *M. bovis*, trois *M. caprae*, trois "*M. pinnipedii*" et un "*M. microti*" chez les bovins. L'analyse phylogénique a identifié 97 spoligotypes différents, représentés par 36 clusters et 61 isolats uniques. Dans l'ensemble, 264 isolats (89,2%) appartenaient au 72 différents types internationaux SIT ou SB, tandis que 24 isolats (8,1%) ont été considérés comme « orphelins » et huit isolats d'origine bovine ont été attribués à sept nouveaux profils SB (SB2695 à SB2701). Les isolats de *M. tuberculosis* ont été classés en six familles dont la Méditerranée latino-américaine (LAM, 29%), T (21,5%), Haarlem (19,6%), Ural (5,6%), S (1,9%) et USA (0,9%). Concernant *M. bovis*, trois profils de spoligotype (SB0120, SB0121 et SB0134) étaient prédominants en Algérie, comme dans d'autres pays d'Afrique du Nord et vingt-huit des spoligotypes sont signalés pour la première fois en Algérie.

La présente étude a montré une grande diversité génétique des souches CMT isolées chez l'homme et les bovins dans le Centre de l'Algérie avec l'isolement de souches de *M. bovis* chez l'homme suggérant une transmission zoonotique de la TB bovine, ce qui nécessite des études moléculaires supplémentaires pour déterminer la proportion d'infection humaine par *M. bovis*.

Mots clés : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*, génotypage, bovin, homme, transmission zoonotique, Algérie.

ملخص

السل من اهم الامراض التي تصيب الحيوان والانسان في العالم. التتميط الجيني مفيد جدا في فهم الوضعية الوبائية للسل. في الجزائر، البيانات حول الوضع الوبائي لهذا المرض والأنماط الجينية لمعقد المتفطرة السلية غير معروفة لحد كبير. في هذا السياق، أجرينا دراسة حول التنوع الجيني لسلاسل العقد المتفطرة السلية لدى الانسان والبقرة في منطقتين بوسط الجزائر باستخدام أدوات البيولوجيا الجزيئية.

في المجموع، تم عزل 296 سلالة من معقد المتفطرة السلية، 181 منها تم عزلها من عينات أنسجة فيها تقرحات مشبوهة بالسل البقري و115 من حالات السل البشري. تم تنميط جميع العزلات بواسطة التتميط الجيني. أظهر التعرف على الأنواع وجود 107 *M. tuberculosis*، 07 *M. bovis* و 01 *M. pinnipedii* لدى الانسان و 174 سلالة *M. bovis*، 03 *M. caprae*، 03 *M. pinnipedii* و 01 *M. microti* لدى البقر.

حدد التحليل الوراثي 97 نمطا مختلفا، ممثلة ب 36 مجموعة و 61 سلالة وحيدة. بشكل عام، 264 عزلة (89,2%) تنتمي الى اسم SIT أو SB، بينما تم اعتبار 24 سلالة (8,1%) يتيمة و 08 سلالات من اصل بقري تم تصنيفها في 07 أنماط جديدة (SB2701-SB2695). تم تصنيف عزلات *M. tuberculosis* الى 06 عائلات بما فيها: LAM (29%)، T (21,5%)، H (19,6%)، U (5,6%)، S (1,9%) و USA (0,9%) فيما يخص *M. bovis* هناك ثلاث أنماط سائدة في الجزائر (SB0120, SB0121 et SB0134)، كما هو الحال في بلدان أخرى في شمال افريقيا، بينما 28 نمط لم يسبقها ذكرها من قبل في الجزائر.

أظهرت الدراسة الحالية تنوعا وراثيا كبيرا في معقد المتفطرة السلية المعزولة عند الانسان والبقرة في منطقة الوسط الجزائري مع عزل سلالات *M. bovis* عند الانسان مما يشير الى انتقال السل البقري الى الانسان، الامر الذي يتطلب دراسات أخرى لتحديد نسبة إصابة الانسان ب *M. bovis*.

الكلمات المفتاحية: معقد المتفطرة السلية ، التتميط الجيني ، البقر ، الإنسان ، انتقال الأمراض حيوانية المنشأ ، الجزائر.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an important disease in animals and humans worldwide. Molecular genotyping is very useful for understanding TB epidemiology. In Algeria, the data about the epidemiology of these infections and *M. tuberculosis* complex (MTBC) genotypes circulating is largely unknown. In this context, we conducted a study on genetic diversity of MTBC strains isolated from cattle and human in two regions of Centre Algeria using molecular tools.

A total of 296 MTBC strains were isolated from 181 tissue samples with bovine TB-suspected lesions and 115 from human TB cases. All isolates were genotyped by spoligotyping. Species identification showed the occurrence of 107 *M. tuberculosis*, 07 *M. bovis* and one “*M. pinnipedii-like*” in human isolates and 174 isolates as *M. bovis*, three as *M. caprae*, three as “*M. pinnipedii-like*” and one as “*M. microti-like*” in cattle. Phylogeny analysis identified 97 different spoligotypes patterns, represented by 36 clusters and 61 unique isolates. Overall, 264 (89.2%) isolates were belonged to 72 different SIT or SB, while 24 (8.1%) isolates could not be assigned a SIT/SB (considered “orphans”) and eight cattle isolates were assigned to seven new SB profiles (SB2695 to SB2701). *M. tuberculosis* isolates were classified into six families including Latin–American Mediterranean (29%), T (21.5%), Haarlem (19.6%), Ural (5.6%), S (1.9%) and USA (0.9%). The most prevalent spoligotype patterns were SIT 42/LAM 9 (13.1%), SIT 53/T1 (7.5%), and SIT 1800/T1 and SIT 50/H3, each with six isolates (5.6%). Concerning *M. bovis*, three spoligotype profiles (SB0120, SB0121 and SB0134) were predominant in Algeria, as in other Northern African countries and twenty-eight of the SB profiles were new to Algeria.

The present study showed a high genetic diversity of strains MTBC isolated from human and cattle in Centre Algeria with isolation of *M. bovis* strains in human suggesting zoonotic transmission of bovine TB, which requires further molecular studies to determine the proportion of human infection with *M. bovis*.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, genotyping, cattle, human, zoonotic transmission, Algeria.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de thèse, je tiens à remercier tout particulièrement :

Madame SAHRAOUI N.

Professeur à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, pour son encadrement, sa rigueur scientifique et sa disponibilité m'ont permis de réaliser ce travail, pour ses conseils avisés ainsi que pour son encouragement. Très sincères remerciements, en témoignage de notre reconnaissance.

Monsieur BERBER A.

Professeur à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, pour avoir co-encadrer ce travail. Remerciements respectueux.

Monsieur KAIDI R.

Professeur à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur HAMIROUNE M.

Maître de Conférences à l'université de Djelfa, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Sincères remerciements.

Madame BOUAYAD L.

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale des Sciences Vétérinaires d'Alger, pour avoir accepté d'examiner mon travail. Sincères remerciements.

Madame BAAZIZI R.

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale des Sciences Vétérinaires d'Alger, pour avoir accepté d'examiner ma thèse. Sincères remerciements.

*Mes sincères remerciements vont aussi au **Pr BOUKE DE JONG C.**, **Pr RIGOUTS L.** ainsi tout le staff de l'Unité de Mycobactériologie, Département des Sciences Biomédicales Institut de Médecine Tropicale (Belgique), pour leur accueil et leur aide technique et matériel en matière de typage moléculaire lors de mon stage au sein de leur laboratoire.*

*Je remercie vivement **Dr. TAHIR D.**, de l'Université Aix-Marseille, pour son aide précieuse, son encouragement, ses conseils et pour le soutien qu'il m'a apporté tout long de ma thèse. Je lui suis infiniment reconnaissante.*

*Au **Pr. BENACHOUR D.**, Président du Comité d'Éthique et de Déontologie de l'Université du Sétif, pour son aide précieuse et son encouragement.*

*Je remercie également **Dr. BOUKERT R.**, Maître Assistant à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, pour son aide précieuse, sa gentillesse et sa patience.*

*Au **Dr. BOUZID N.**, Inspecteur vétérinaire principal au niveau Direction des Services Agricole de la wilaya de Béjaia, pour sa précieuse aide pour la réalisation des prélèvements.*

Je remercie également toute équipe du Service de Contrôle de la Tuberculose et les Maladies Respiratoires de la wilaya de Béjaia et Sétif, pour leur aide, leur gentillesse et leur patience.

DEDICACES

À celle qui m'a beaucoup soutenue dans les épreuves de ma vie, ma très chère mère, mon estime, ma source de force, ma gratitude.

À mes chères sœurs.

À mon frère et sa famille.

À toute ma grande famille.

À ma très chère princesse Héline, ma source de joie et de force

J'adresse mes vifs remerciements à mes collègues et mes ami(e)s, pour leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail.

**MERCI A DIEU TOUT PUISSANT DE M'AVOIR PROTEGE ET GUIDE MES PAS
VERS LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	2
REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES	8
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	13
INTRODUCTION.....	17
CHAPITRE 1 : RAPPELS SUR LA TUBERCULOSE.....	20
1.1 Définition	20
1.2 Historique	20
1.3 Importance	23
1.3.1 Sur le plan économique.....	23
1.3.2 Sur le plan hygiénique.....	24
1.4 Taxonomie et classification	24
1.4.1 Classification selon le pouvoir pathogène	25
1.4.1.1 Mycobactéries pathogènes (tuberculeuses).....	25
1.4.1.1.1 Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMT).....	25
1.4.1.1.2 Mycobactéries responsables de la lèpre	28
1.4.1.2 Mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses (MNT)	28
1.4.1.2.1 Mycobactéries opportunistes (pathogènes potentiels)	29
1.4.1.2.2 Mycobactéries saprophytes (non pathogènes).....	30
1.4.2 Classification selon la vitesse de croissance.....	30
1.4.3 Classification par analyse du génome (phylogénie)	31
1.5 Morphologie	31
1.6 Génome	34
1.7 Biologie	35
1.7.1 Caractères cultureux	35
1.7.2 Caractères biochimiques.....	35
1.7.3 Résistance aux agents physico-chimiques.....	35
1.7.4 Virulence	37
CHAPITRE 2 :EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE HUMAINE ET BOVINE	39
2.1 Epidémiologie descriptive.....	39
2.1.1 Situation épidémiologique mondiale de la tuberculose humaine	39
2.1.1.1 Situation épidémiologique de la tuberculose humaine en Algérie	40
2.1.2 Situation épidémiologique mondiale de la tuberculose bovine	41

2.1.2.1 Situation épidémiologique de la tuberculose bovine en Algérie	44
2.1.3 Situation épidémiologique de la tuberculose zoonotique.....	45
2.2 Epidémiologie analytique	47
2.2.1 Transmission (Voie, mode et source).....	47
2.2.2 Conditions d'infection et les facteurs de risque	49
2.2.2.1 Pour l'homme	49
2.2.2.1.1 Facteurs intrinsèques	49
2.2.2.1.2 Facteurs extrinsèques.....	51
2.2.2.2 Pour le bovin	52
2.2.2.2.1 Facteurs tenant aux bacilles tuberculeux	52
2.2.2.2.2 Facteurs tenant à l'hôte.....	53
2.2.2.2.2.1 À l'échelle individuelle	53
2.2.2.2.2.2 À l'échelle du troupeau.....	54
CHAPITRE 3 : ETUDE CLINIQUE ET DIAGNOSTIQUE DE LA TUBERCULOSE	
.....	56
3.1 Pathogénie.....	56
3.2 Réaction immunitaire antituberculeuse	57
3.3 Manifestations cliniques	59
3.3.1 Chez l'homme	59
3.3.1.1 Tuberculose pulmonaire.....	59
3.3.1.2 Tuberculose extra-pulmonaire.....	59
3.3.1.3 Tuberculose chez la femme enceinte.....	61
3.3.1.4 Tuberculose chez l'enfant	62
3.3.1.5 Tuberculose zoonotique.....	62
3.3.2 Chez le bovin	62
3.4 Diagnostic	63
3.4.1 Diagnostic épidémio-clinique.....	63
3.4.1.1 Chez l'homme	63
3.4.1.2 Chez le bovin	63
3.4.2 Examen nécropsique	64
3.4.3 Diagnostic de laboratoire.....	64
3.4.3.1 Méthodes directes.....	64
3.4.3.1.1 Examen radiologique.....	64
3.4.3.1.2 Examen histopathologique	64
3.4.3.1.3 Examen microscopique	65
3.4.3.1.3.1 Coloration de Ziehl Neelsen	65
3.4.3.1.3.2 Coloration fluorescente à l'auramine	66

3.4.3.1.4 Culture bactérienne	67
3.4.3.1.4.1 Milieux de culture	69
3.4.3.1.5 Identification phénotypique des mycobactéries	74
3.4.3.1.6 Identification antigénique par immuno-chromatographie.....	74
3.4.3.1.7 Identification par chromatographie et spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	75
3.4.3.1.8 Diagnostic moléculaire de la tuberculose	76
3.4.3.1.8.1 Détection des mycobactéries dans les échantillons cliniques	76
3.4.3.1.8.2 Identification moléculaire des espèces mycobactériennes à partir des cultures.....	77
3.4.3.1.9 Typage moléculaire	78
3.4.3.1.9.1 RFLP IS6110 (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	78
3.4.3.1.9.2 Spoligotypage (Spoligotyping: Spacer OLIGOnucleotide TYPING)	79
3.4.3.1.9.3 MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats).....	81
3.4.3.1.9.4 Typage par région de délétion (RD)	82
3.4.3.1.9.5 Polymorphisme nucléotidique unique (SNP)	82
3.4.3.1.9.6 Séquençage complet du génome (WGS : Whole Genome Sequencing).....	82
3.4.3.2 Méthodes indirectes	83
3.4.3.2.1 Mise en évidence de l'immunité à médiation cellulaire.....	83
3.4.3.2.1.1 Intradermo-tuberculation	83
3.4.3.2.1.2 Tests de libération d'interféron gamma (IGRA)	86
CHAPITRE 4 :TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE	88
4.1 Traitement de tuberculose humaine	88
4.1.1 Médicaments antituberculeux.....	88
4.1.1.1 Molécules de première ligne	88
4.1.1.2 Molécules de deuxième ligne	890
4.1.1.3 Molécules de troisième ligne	890
4.1.1.4 Molécules en développement.....	890
4.1.2 Schéma thérapeutique	890
4.1.2.1 Schémas thérapeutiques pour les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire.....	890
4.1.2.2 Schémas thérapeutiques pour les patients antérieurement traités.....	91
4.1.2.3 Schémas de traitement de la tuberculose résistante.....	91
4.1.3 Suivi du traitement	92
4.1.4 Autres formes de traitement	92
4.2 Traitement de la tuberculose bovine	92

4.3 Prophylaxie	92
4.3.1 Prophylaxie de la tuberculose humaine.....	92
4.3.2 Prophylaxie de la tuberculose bovine.....	95
4.3.2.1 Prophylaxie médicale	95
4.3.2.2 Prophylaxie sanitaire	95
4.3.2.2.1 Mesures défensives	95
4.3.2.2.2 Mesures offensives	96
4.3.3 Prophylaxie de la tuberculose zoonotique.....	97
PARTIE EXPERIMENTALE	99
CHAPITRE 05 :INSPECTION SANITAIRE ET ANALYSE BACTERIOLOGIQUE	100
5.1 Introduction	100
5.2 Cadre d'étude.....	100
5.3 Matériel et Méthodes.....	102
5.3.1 Collecte d'échantillons.....	102
5.3.1.1 Echantillons d'origine humaine.....	102
5.3.1.2 Echantillons d'origine bovine	102
5.3.2 Acheminement et conservation des prélèvements.....	103
5.3.3 Examen bactériologique.....	104
5.3.3.1 Préparation d'échantillon tissulaire.....	104
5.3.3.2 Examen direct (microscopie) : Coloration de Ziehl-Neelsen.....	104
5.3.3.3 Lecture des frotti et interprétation des résultats	105
5.3.3.4 Culture bactérienne	106
5.3.3.5 Lecture et identification phénotypique	107
5.4 Analyses statistiques.....	107
5.5 Résultats	108
5.5.1 Inspection <i>post-mortem</i>	108
5.5.1.1 Prévalence des lésions suspectes de la tuberculose bovine selon les facteurs du risque dans les quatre abattoirs	108
5.5.1.2 Distribution des lésions suspectes de la tuberculose bovine par organe.....	109
5.5.2 Examen bactériologique.....	111
5.5.2.1 Echantillons d'origine bovine.....	111
5.5.2.2 Echantillons d'origine humaine.....	112
5.6 Discussion.....	113
5.7 Conclusion	115

CHAPITRE 6 :IDENTIFICATION MOLECULAIRE PAR SPOLIGOTYPAGE, PHYLOSNP ET PCR-RD MULTIPLEX	116
6.1 Introduction	116
6.1.1 Spoligotypage	116
6.1.1.1 Inactivation des souches par la chaleur (lyse cellulaire)	116
6.1.1.2 Amplification d'ADN par PCR.....	117
6.1.1.2.1 Principe	117
6.1.1.2.2 Matériel	117
6.1.1.2.3 Solutions	117
6.1.1.2.4 Protocole.....	118
6.1.1.2.4.1 Pré-PCR : Préparation du milieu réactionnel (Mix PCR)	118
6.1.1.2.4.2 Amplification.....	118
6.1.1.3 Hybridation des produits amplifiés sur la membrane Biodyne C	119
6.1.1.3.1 Principe	119
6.1.1.3.2 Matériel	119
6.1.1.3.3 Solutions	120
6.1.1.3.4 Protocole.....	120
6.1.1.3.4.1 Préparation des tampons	120
6.1.1.3.5 Réutilisation de la membrane.....	122
6.1.1.4 Lecture et analyse des résultats.....	122
6.1.2 PhyloSNP.....	123
6.1.3 PCR-RD Multiplex	124
6.2 Résultats	125
6.3 Discussion.....	132
6.4 Conclusion	135
CONCLUSION GENERALE.....	136
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	137
APPENDICE	138
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

A. LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Profils historiques.....	23
Figure 1.2: Aspect morphologique des mycobactéries au microscope électronique à transmission	32
Figure 1.3: Structure schématique de la paroi cellulaire des mycobactéries.....	33
Figure 2.1: Estimation du taux d'incidence de la tuberculose humaine (incidence/100 000) pour l'année 2019.....	40
Figure 2.2: Evolution du taux d'incidence de la tuberculose humaine en Algérie..	41
Figure 2.3: Répartition géographique de la tuberculose bovine chez les animaux domestiques et sauvages dans le monde durant la période du janvier 2017 au juin 2018.....	42
Figure 3.1: Nombreux nodules jaunâtres ressemblent à des perles sur le tissu pulmonaire (forme perlée)	57
Figure 3.2: Altération granulomateuse des poumons avec formation des cavités (forme ouverte de la tuberculose).....	57
Figure 3.3: Coupe histologique colorée par HE d'un granulome tuberculeux.....	65
Figure 3.4: Frottis d'un crachat coloré par Ziehl-Neelsen.....	66
Figure 3.5: Coloration fluorescente à l'auramine du frottis d'un crachat.....	66
Figure 3.6: Aspect des colonies du <i>M. bovis</i> sur L-J.....	70
Figure 3.7: Aspect des colonies du <i>M. tuberculosis</i> sur L-J.....	70
Figure 3.8: Agrégation des BAAR sous forme des cordes (Cord Factor positif) dans un frottis réalisé à partir d'une culture positive et coloré par ZN.....	72
Figure 3.9: Milieu MGIT 960.....	73
Figure 3.10: Profils génomiques en spoligotypage de quelques membres du CMT	80
Figure 5.1: Distribution géographique de la zone d'étude dans les deux wilayas	101
Figure 5.2: Préparation d'échantillon.....	104
Figure 5.3: Etapes de la coloration ZN.....	105
Figure 5.4: Aspect microscopique des BAAR colorés par ZN	106

Figure 5.5: Etapes de la décontamination par la soude	107
Figure 5.6: Atteinte tuberculeuse du NL et tissu pulmonaire.....	110
Figure 5.7: Granulome tuberculeux rond avec une nécrose caséuse sèche au niveau du tissu et NL du testicule.	110
Figure 5.8: Nombreux petits tubercules de couleur jaune à gris-rougeâtre au niveau de la plèvre pariétale et l'utérus d'une vache âgée plus de 5 ans.....	110
Figure 5.9: Aspect des cultures des mycobactéries sur milieu L-J.....	112
Figure 5.10: Aspect des colonies du <i>M. tuberculosis</i> sur L-J	113
Figure 6.1: Profils génomiques obtenus par spoligotypage.....	123
Figure 6.2: Arbre phylogénétique des 97 spoligotypes des 296 souches CMT d'origine humaine et bovine.....	127
Figure 6.3: Répartition de six familles identifiées par spoligotypage à partir des souches <i>M. tuberculosis</i> isolées chez l'homme.	130
Figure 6.4: Distribution des spoligotypes (SIT) des souches <i>M. tuberculosis</i> isolées chez l'homme dans la wilaya de Béjaia et Sétif.	130
Figure 6.5: Distribution du CMT isolés chez l'homme selon la forme de tuberculose dans la wilaya de Béjaia et Sétif.	131

B. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Estimation de l'incidence mondiale de la tuberculose humaine en 2019	39
Tableau 2.2: Aperçu sur certains rapports sur les prévalences de la tuberculose bovine estimées par l'inspection post-mortem dans différents pays africains.	43
Tableau 2.3: Prévalence de la tuberculose bovine dans quelques wilayas de la région Centre et Est algérien.	44
Tableau 2.4: Estimation de l'incidence et la mortalité de la tuberculose humaine due à <i>M. bovis</i> dans différents continents.	45
Tableau 2.5: Aperçu sur les études ayant rapportées l'isolement du <i>M. bovis</i> chez l'homme dans certains pays d'Afrique.	46
Tableau 3.1: Identification d'espèces à partir des caractéristiques phénotypiques	74
Tableau 3.2: Interprétation de l>IDR selon le statut vaccinal chez l'enfants moins de 15 ans.....	84
Tableau 3.3: Valeurs des épaissements du pli de peau prise en compte pour le résultat d'une IDS	85
Tableau 3.4: Valeurs des épaissements du pli de peau prise en compte pour le résultat d'une IDC	86
Tableau 5.1: Répartition de la prévalence des lésions suggestives de la tuberculose bovine dans quatre abattoirs de la région Centre de l'Algérie (2017-2019) ..	108
Tableau 5.2: Prévalence des lésions suggestives de la tuberculose bovine selon l'âge, le sexe et la race.	109
Tableau 5.3: Distribution des lésions suggestives de la tuberculose bovine dans différents organes.	111
Tableau 5.4: Résultats de la microscopie et la culture.	112
Tableau 5.5: Caractéristiques démographiques et cliniques des patients tuberculeux.	113
Tableau 6.1: Protocole de préparation du Mix PCR du spoligotypage.	118
Tableau 6.2: Programme d'amplification par PCR du spoligotypage.	119
Tableau 6.3: Protocole de préparation du Mix PCR du PhyloSNP.....	124
Tableau 6.4: Programme d'amplification par PCR de PhyloSNP.	124

Tableau 6.5: Protocole de préparation du Mix PCR-RD Multiplex.....	125
Tableau 6.6: Programme d'amplification par PCR Multiplex.	125
Tableau 6.7: Comparaison entre les spoligotypes identifiés dans la présente étude avec ceux qui ont été précédemment rapportés en Algérie et dans les pays du Nord-africain et Sud d'Europe	128
Tableau 6.8: Distribution des clades <i>M. tuberculosis</i> identifiés dans les deux wilayas.....	129
Tableau 6.9: Distribution du CMT isolés chez l'homme selon la forme de tuberculose dans la wilaya de Béjaia et Sétif.	131

INTRODUCTION

La tuberculose est une maladie importante au niveau mondial tant chez l'homme que chez l'animal [1], Cette importance est liée non seulement à son impact sur la santé publique, mais également aux pertes économiques qu'elle peut engendrer [2].

Malgré les grands progrès réalisés au cours des dernières décennies pour la lutte contre la tuberculose humaine, la maladie reste l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde [3].

L'Algérie fait partie des pays où la tuberculose humaine et bovine est endémique. En 2018, plus de 23 000 cas de tuberculose humaine ont été déclarés dans ses deux formes, pulmonaire 7 053 cas (30,6%) et extra-pulmonaire avec 16 025 cas (69,4%), une situation qui démontre une émergence de la forme non contagieuse et un recul de la forme contagieuse. Même si l'Algérie avait réussi à inverser la tendance de la tuberculose pulmonaire vers la baisse, la tuberculose extra-pulmonaire est aujourd'hui un défi criant à relever [4] et pour obtenir une explication de cette émergence, il convient une identification des souches responsable de la maladie. Cependant, le diagnostic de routine de la maladie est limité aux outils conventionnels tels que l'examen microscopique utilisant la technique de Ziehl-Neelsen (ZN) et la culture d'échantillons sur milieu Löwenstein-Jensen (L-J) sans mener un diagnostic jusqu'au stade d'identification et caractérisation des souches impliquées. En plus les laboratoires concentrent leurs efforts sur l'isolement de *M. tuberculosis*, de sorte que l'on peut supposer que tous les cas de tuberculose humaine sont causés par *M. tuberculosis*. Alors qu'il existe d'autres espèces qui peuvent provoquer la maladie (espèces appartenant au CMT ou des mycobactéries non tuberculeuses).

Quand la tuberculose bovine, malgré les efforts consentis par les autorités algériennes pour lutter contre la maladie par la mise en place d'un programme national de dépistage par intradermo-tuberculation et l'élimination de tous les cas positifs, combiné à l'inspection des viandes au niveau des abattoirs et à la saisie des carcasses atteintes, la tuberculose bovine reste répandue (3,6%) [5].

La tuberculose bovine est une zoonose majeure provoquée par *M. bovis*, qui se transmet à l'homme par ingestion (par exemple, la consommation de lait non pasteurisé), par inhalation ou par contact avec les muqueuses et les plaies cutanées [6]. L'infection humaine par *M. bovis* est souvent associée à une maladie extra-pulmonaire [7]. Les données sur la prévalence de l'infection humaine par *M. bovis* sont rares mais généralement plus élevées dans les régions à faible revenu, avec une prévalence élevée chez les bovins [8] ;[9]. On estime qu'environ 70 000 cas surviennent chaque année en Afrique [10].

Au cours des dernières années, le développement de méthodes d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose a contribué à une meilleure compréhension de cette maladie et de son agent causal (CMT) [11]. Parmi celles-ci, le spoligotypage est actuellement l'une des plus répandues. Cette approche simple basée sur la PCR est utile pour étudier la phylogéographie des membres CMT. Le spoligotypage s'est avéré être une méthode pratique et discriminatoire pour les études à grande échelle de l'épidémiologie de *M. bovis* ainsi que pour la différenciation de *M. bovis* de *M. tuberculosis* [12].

En Algérie, il existe peu d'études concernant les génotypes impliqués dans l'infection tuberculeuse humaine et bovine, en raison des ressources limitées de nombreux laboratoires pour isoler et identifier les souches responsables de la maladie [5];[13] ;[14];[15]. Cette étude fixe comme objectif :

- Estimer la prévalence de la tuberculose bovine dans deux wilayas de la région Centre de l'Algérie ;
- Déterminer la diversité génétique des souches du CMT isolées chez l'homme et les bovins par biologie moléculaire ;
- Mettre en évidence le caractère zoonotique de la tuberculose bovine en Algérie, ainsi déterminer la proportion de l'infection humaine par *M. bovis*.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

RAPPELS SUR LA TUBERCULOSE

1.1 Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse, commune à l'homme et à de nombreuses espèces animales [16]. Elle est transmissible essentiellement par voie aérienne, due à un ensemble de mycobactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* [17]. Elle est caractérisée par le développement progressif des lésions granulomateuses ou de tubercules dans le tissu pulmonaire, les nœuds lymphatiques ou d'autres organes [18]. Cliniquement, la maladie a une évolution le plus souvent chronique et grand polymorphisme [16].

1.2 Historique

L'histoire de la tuberculose remonte au berceau de l'humanité et son évolution semble avoir suivi celle de l'homme [19] ; [20]. La première suspicion de la tuberculose chez l'homme repose sur l'observation de lésions de la voûte crânienne de 500 000 ans en Turquie. Cependant cette observation morphologique n'a pas été étayée par les éléments microbiologiques. Les momies de l'ère prédynastique égyptienne et les momies péruviennes de l'époque précolombienne présentent des lésions vertébrales confirmées de tuberculose appelées « mal de Pott ». Cette spondylodiscite est considérée comme pathognomonique de la maladie pour les paléopathologistes [21].

Trois formes principales de maladie ont été désignées par les historiens comme étant de la tuberculose : « mal de Pott » définit par des séquelles caractéristiques au niveau des vertèbres, les scrofules correspondent à des ganglions infectés au niveau du cou avec écoulement de pus et la tuberculose pulmonaire dont les épidémies à grande échelle ont été identifiées au XVII^{ème} siècle. La maladie fut dénommée « phtisie pulmonaire » ou consommation [20] ; [22].

Avant les découvertes des anatomopathologistes puis celles des bactériologistes, la phtisie était une maladie sournoise, voire mystérieuse du fait des formes multiples, ses symptômes diffus et peu explicites valurent le qualificatif de « Peste

blanche ». Tuberculeux ou phtisique apparaissait ainsi « émacié, essoufflé, couvert de sueur, livide et toussant », d'où le terme « consommation » [23].

Au XIX^{ème} siècle, trois médecins furent à l'origine d'une nouvelle conception de la tuberculose.

En 1810, René Laennec montra l'unicité des lésions de la tuberculose en établissant une synthèse des symptômes et des formes cliniques de ces lésions que l'on attribuait jusque-là à différentes pathologies [24].

En 1865, Jean-Antoine Villemin montra que la tuberculose était une maladie infectieuse, contagieuse et inoculable [25].

Parrot (1876) et Küss (1898), dans la loi qui porte leurs noms établissent que l'atteinte alvéolaire (chancre d'inoculation) précède toujours l'adénopathie satellite. C'est le complexe primaire pour Ghon (1912) [25].

Le 24 mars 1882, le médecin allemand Robert Koch (Cf. figure 1.1.A) communique à la société de physiologie de Berlin la découverte de micro-organisme responsable de la tuberculose pulmonaire mortelle, nommé « Tuberkelvirus » dans sa publication séminale. Couramment dénommé par la suite bacille de Koch (BK) puis *M. tuberculosis* en 1883. La mise au point d'une coloration spécifique permettant la détection microscopique de *M. tuberculosis* par Robert Koch et son équipe [21]. En montrant peu après que le bacille coloré par la fuchsine anillinée n'est pas décoloré par l'acide nitrique au tiers. Ehrlich met en évidence l'acidorésistance des mycobactéries. Ziehl remplaça bientôt la fuchsine anillinée par la fuchsine phéniquée et Neelsen publia la méthode de coloration dite Ziehl-Neelsen [26].

En 1890, Robert Koch obtint une préparation réalisée à partir du bacille dénommée « tuberculine » [27]. En 1891, découverte du phénomène de Koch (l'inoculation du BK au cobaye déjà tuberculisé entraîne une réaction locale nécrotique due à la tuberculine sécrétée par le bacille tuberculeux [25]. Cette grande découverte a donné à Robert Koch le prix Nobel de médecine en 1905 pour ses recherches et ses découvertes en matière de tuberculose [21].

En 1898, Theobald Smith fit la distinction entre *M. bovis* et *M. tuberculosis* sur la base de leurs caractéristiques culturelles in vitro et l'étude de leur virulence [16].

En 1907, Clemens Von Pirquet invente le test de sensibilité à la tuberculine capable à identifier des individus qui ont des antécédents d'infection tuberculeuse. En 1908, Charles Mantoux introduit l'utilisation d'une aiguille et seringue pour injecter la tuberculine par voie intradermique [28].

En 1908-1920, Albert Calmette (Cf. figure 1.1.B) en collaboration avec Camille Guérin (Cf. figure 1.1.C) s'aperçurent que des bacilles tuberculeux d'origine bovines, précédemment virulents étaient devenus subitement inoffensifs, des cultures répétées pendant 11 ans fait perdre leur pouvoir pathogène. Après avoir constaté que les animaux infectés par ces souches de bacilles atténuées étaient immunisés contre la tuberculose. Ils s'intégrèrent ces bacilles au vaccin connu sous le nom BCG (bacille de Calmette et Guérin) [29]. Ce vaccin fût appliqué à l'homme pour la première fois en 1921[16].

La découverte de *M. tuberculosis* comme agent responsable de la tuberculose a ouvert la voie aux premiers traitements [30] , streptomycine (SM) en 1943 puis acide para-aminosalicylique (PAS) en 1946 ont été parmi les premiers médicaments cliniquement importants après les sulfamides. Ils ont été suivis rapidement par l'isoniazide (INH) et le pyrazinamide (PZA) en 1952, ethambutol (EMN) en 1961 et la rifampicine (RIF) en 1966 [31].

En 1959, Runyon décrit un système de classification pour les mycobactéries selon la vitesse de croissance [32].

En 1984, la mise au point de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a permis de confirmer l'existence d'agents infectieux pathogènes, dont ceux de la tuberculose sur des restes humains anciens. Une technique des empreintes génomique s'est développée dès 1993 à partir de la détection du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP), nommé IS6110 a été isolée [33]. En 2001, Albert Zink et coll ont appliqué cette technique à l'étude d'une série de 41 momies égyptiennes [34]. En 1997, la technique de spoligotypage a été développée [35].

En 1998, Institut Pasteur (France) et Center Sanger (Royaume Unis) ont séquencé le génome de *M. tuberculosis* [36].

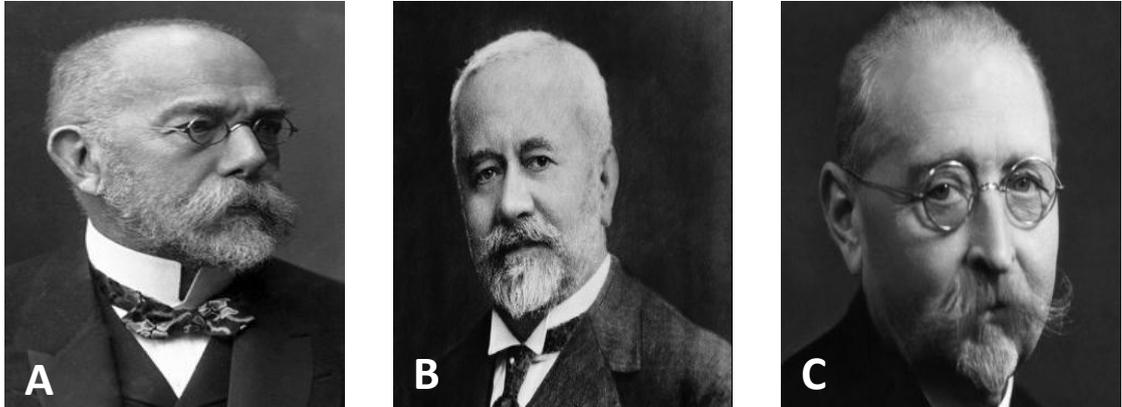


Figure 1.1 : Profils historiques. A) Robert Heinrich Herman Koch [37], **B)** Léon Charles Albert Calmette, **C)** Jean-Marie Camille Guérin [38].

1.3 Importance

La tuberculose est importante au niveau mondial tant chez l'homme que chez l'animal [1], cette importance est liée non seulement à son impact sur la santé publique, mais également aux pertes économiques qu'elle peut engendrer [2] ;[39] ;[40].

1.3.1 Sur le plan économique

La tuberculose bovine représente un problème économique majeur [41]. Elle engendre un taux de morbidité accru et des mortalités qui diminuent le capital financier de l'exploitation et augmentent le coût de production [42]. Les pertes économiques dues à la tuberculose bovine sont liées à la production animale, à la commercialisation des animaux et des produits d'origine animale, aux coûts de la mise en œuvre des programmes de surveillance et de contrôle [18], ainsi aux saisies des viandes. Il est extrêmement difficile de déterminer l'impact économique de la maladie sur la production animale [43]. Néanmoins, On estime que les pertes économiques dans le monde représentent plus de 3 milliards de dollars par an [44].

1.3.2 Sur le plan hygiénique

La tuberculose humaine est l'une des 10 premières causes de mortalité dans le monde, et la deuxième cause de décès lié aux maladies infectieuses après l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH). Néanmoins la maladie est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans de nombreux pays du monde. Environ un tiers de la population mondiale est infecté par *M. tuberculosis*. En 2019, près de 10 millions de personnes ont contracté la maladie et 1,4 millions en sont mortes, plus de 95% des décès surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire [3].

La tuberculose humaine multi-résistante demeure une crise de santé publique et une menace pour la sécurité sanitaire, en 2019, OMS estime près de 206 030 de nouveaux cas présentant une résistance à la rifampicine, le médicament de première intention le plus efficace [3]. Le développement des souches résistantes aux médicaments compromis l'efficacité du traitement de la tuberculose chez l'homme et accru de façon considérable les coûts liés à l'utilisation de multiples médicaments [45].

La tuberculose bovine est une zoonose majeure [46], qui peut avoir des conséquences graves sur la santé publique [18]. L'OMS, estime que *M. bovis* serait impliqué dans plus de 3% des cas mondiaux de la tuberculose chez l'homme essentiellement localisés dans les pays en voie de développement [47]. Dans ces pays, il existe un parallélisme entre la prévalence de la tuberculose bovine et celle de la tuberculose humaine. Ainsi, 5 à 30% des cas humains de la tuberculose sont causés par *M. bovis* (ou *M. caprae*) dans les différents pays en voie de développement où la tuberculose bovine est enzootique [41]. En Afrique, on estime à environ 70 000 le nombre de cas de tuberculose zoonotique survenus annuellement [10]. Cependant, dans les pays développés, *M. bovis* représente généralement une part insignifiante de l'ensemble des cas de tuberculose chez l'homme [18].

1.4 Taxonomie et classification

L'agent étiologique de la tuberculose se caractérise par une taxonomie en constante évolution.

Les bacilles tuberculeux sont des bactéries appartenant à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae*, à l'ordre des *Actinomycetales* et au genre *Mycobacterium* [48]. Ce dernier est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des *Actinomycetales* auquel appartiennent de nombreux genres [49]. Toutes les bactéries de cet ordre possèdent une propriété particulière d'acido-alcool- résistance [16]. Le genre *Mycobacterium* regroupe un grand nombre d'espèces, non seulement le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) et *Mycobacterium leprae*, qui sont strictement pathogènes, mais aussi des mycobactéries dites non tuberculeuses ou atypiques [50].

La diversité phénotypique, physiologique, écologique et pathogénique des espèces placées au fur et à mesure de leur découverte dans ce genre a mené à l'élaboration de plusieurs classifications [51].

1.4.1 Classification selon le pouvoir pathogène

Dans la famille des mycobactéries, on distingue deux groupes :

1.4.1.1 Mycobactéries pathogènes (tuberculeuses)

1.4.1.1.1 Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMT)

La tuberculose est provoquée par des bacilles, rassemblés en un groupe nommé CMT, qui inclut les mycobactéries partageant plus 99,9% d'identité au niveau de leur ADN génomique [52]. Cependant elles diffèrent largement en termes de tropisme d'hôtes, de phénotypes et de pathogénicité [53]. Ce complexe comprend à ce jour 11 espèces : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. orygis* et le dassie bacillus [54].

Mycobacterium tuberculosis : est reconnu comme le principal agent étiologie de la tuberculose humaine [55]. Chez les animaux domestiques (bovins, ovins, caprins, porcs, chevaux, chiens et chats), les infections dues à *M. tuberculosis* sont rares [56]. Cette espèce est rencontrée également chez d'autres primates, et occasionnellement chez le rhinocéros, l'éléphant et certains cervidés et le perroquet [57].

Mycobacterium africanum : a été isolé et décrite pour la première fois au Sénégal en 1968 [58]. C'est un pathogène de l'homme, endémique en Afrique de l'ouest [52], où il peut être impliqué dans la moitié des cas de la tuberculose humaine [59]. Mais il a été isolé de façon sporadique sur des bovins [60] ;[61] et des singes [62]. *M. africanum* comprend deux lignées phylogénétiquement distinctes : *M. africanum* West Africain 1 (MWA1) et *M. africanum* West Africain 2 (MWA2). Cependant, MWA1 est davantage spécifique à la région du golfe alors que MWA2 prédomine dans les régions côtières ouest africaines. Ces deux lignées faisaient partie de *M. africanum* type 1 (MAT1) par opposition à *M. africanum* type 2 (MAT2) qui fut reclassifié au sein de *M. tuberculosis* sous le nom « famille Uganda » [63].

Mycobacterium canettii (Smooth Tubercle Bacilli) : est un membre rare de CMT responsable de moins de 100 cas de la tuberculose signalés chez les patients à la corne de l'Afrique [64]. il a été isolé pour la première fois chez un agriculteur français âgé de 20 ans atteint de la tuberculose pulmonaire par Georges Canetti en 1969 [30]. Sa particularité est l'aspect lisse des colonies en culture, la distinguant des autres espèces du complexe *tuberculosis*. Par ailleurs, il présente une grande diversité génétique, bien supérieur à celle *M. tuberculosis*. Le réservoir et le mode de transmission de *M. canettii* restent totalement inconnus et l'hypothèse d'un réservoir environnemental est la plus souvent évoquée. Les descriptions cliniques d'infections à *M. canettii* sont dominées par les localisations pulmonaires (52%) et extra-thoraciques avec un tropisme ganglionnaire (32%) essentiellement observées chez les patients ayant séjournés dans la corne de l'Afrique en particulier à Djibouti [65].

Mycobacterium bovis : est le principal agent causal de la tuberculose bovine [42]. Il peut également infecter de nombreuses autres espèces animales domestiques (grands et petits ruminants, suidés, équidés, canidés, félidés) et sauvages (cervidés, mustélidés, canidés) ainsi que l'homme [66].

Mycobacterium pinnipedii : était anciennement connue sous le nom de « bacille de phoque », car il a été découvert pour la première fois chez trois espèces différentes de phoque otariidés en Australie occidentale entre 1981 et 1986 [67]. Cette mycobactérie affecte principalement les mammifères marins pinnipèdes (phoques, morses, léopards de mer), mais elle est également pathogène pour les cobayes, les

lapins, l'homme et éventuellement les bovins [68]. En ce qui concerne le phénotype, *M. pinnipedii* est une mycobactérie à croissance lente (3 à 6 semaines), les colonies sont dysgoniques, rugueuses et non chromogéniques [69].

Mycobacterium caprae : peut infecter de nombreux animaux domestiques surtout les caprins, les bovins et les porcs, mais aussi le gibier (cervidés, renards et sangliers) [5] ;[56]. C'est également un agent zoonotique important [10]. Cette mycobactérie a été isolée pour la première fois sur des chèvres en Espagne [70] ;[71], par Aranaz et al, qui l'avaient déjà identifié comme *M. tuberculosis* ssp *caprae*. Toutefois, après la comparaison de ses propriétés biochimiques et génétiques avec *M. tuberculosis* il a été suggéré de le renommer *M. bovis* ssp *caprae* [70] ;[72]. En 2003, il est élevé au rang d'espèce, soit *M. caprae* par Aranaz et ses collègues [73].

Mycobacterium microti : découvert par Wells dans les années 1930 [74], à cette époque, le bacille était décrit comme agent responsable d'une maladie épizootique chez le campagnol sauvage (*Microtus agrestis*) [75]. *M. microti* est généralement considéré comme agent pathogène des petits rongeurs (campagnols des champs, campagnols des prés, souris des bois et musaraignes) [74] ;[76] ;[77], il a été signalé occasionnellement chez certains nombres d'autres espèces, notamment le blaireau et le chien furet [78], les bovins [79], le chien [80] et l'homme (bien que les personnes immunodéprimées soient les plus touchées) [78] ; [81] ; [82]. Cette mycobactérie se développe lentement sur un milieu solide additionné du pyruvate et présente des propriétés biochimiques similaires à celles de *M. tuberculosis* [82] ; [83]. En effet, au cours des années 1950, *M. microti* a été utilisé dans des essais à grande échelle sur l'homme comme vaccin antituberculeux au Royaume-Uni et en Tchécoslovaque [84] ; [85] ; [81].

Mycobacterium orygis : généralement connu sous le nom *oryx bacillus* [52]. il a été isolé pour la première fois en 1976 sur des oryx en Afrique de l'Est [86]. *M. orygis* affecte une grande variété d'hôtes à savoir : le buffle sauvage d'Afrique [87], l'antilope, l'oryx, le daim, le cerf, le bovin, le singe Rhésus et l'homme. La majorité des souches de *M. orygis* ont une origine le sud-asiatique [52].

D'autres espèces animales phylogénétiquement proches de *M. africanum* West African 2 ont été isolées sur des animaux en Afrique :

Mycobacterium mungji : est agent pathogène émergent du CMT, infecte les mangoustes rayées sauvages (*Mungos mungo*) dans le Nord du Botswana [88] ; [89]. Le délai entre l'apparition des symptômes et le décès des mangoustes affectées est généralement court (2 à 3 mois) [89].

Dassie bacillus : a été isolé pour la première fois dans les poumons d'un dassie dans l'Est du Cap en Afrique de sud en 1950 [90].

Mycobacterium suricattae : provoque la tuberculose chez les suricates (*Suricata suricatta*) en Sud de l'Afrique [91].

1.4.1.1.2 Mycobactéries responsables de la lèpre

Mycobacterium leprae et *Mycobacterium lepraemurium*, les agents de la lèpre, caractérisés par leur incapacité à être cultivés in vitro [19]. Chez l'homme la lèpre ou « maladie de Hansen », est une maladie infectieuse chronique qui affecte principalement la peau, les nerfs périphériques, les voies respiratoires supérieures et les yeux. Elle est causée par *M. leprae* [92], découverte pour la première fois dans des nodules des patients par Armauer Hansen en 1873 [93]. Par ailleurs, *M. lepraemurium* est l'agent responsable de la lèpre murine, une maladie granulomateuse chronique semblable à la lèpre humaine [94]. La maladie a été signalée pour la première fois au début de XX^{ème} siècle chez le rat en Ukraine [95].

1.4.1.1.2 Mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses (MNT)

Ce sont des bactéries présentes dans l'environnement et habituellement non pathogènes. Elles sont responsables d'infections opportunistes, simulant ou non à la tuberculose, appelées mycobactérioses [96]. Elles se différencient du CMT par leur moindre virulence et l'absence de transmission interhumaine [97]. Les cas épidémiques étant liés à une contamination à partir d'un réservoir commun, exclusivement environnemental, qu'est le plus souvent l'eau [98].

Il existe actuellement environ 150 espèces de mycobactéries non tuberculeuses [99]. Parmi celles-ci, différents complexes sont observés dont le plus important le complexe *Mycobacterium avium* (MAC) [100]. Les MNT sont classées en deux catégories :

1.4.1.2.1 Mycobactéries opportunistes (pathogènes potentiels)

Elles présentent un pouvoir pathogène pour l'homme et les animaux [69] ; [101]. Ces mycobactéries provoquent des infections peu ou pas contagieuses, cliniquement similaires à la tuberculose, habituellement bénignes (mais il existe des exceptions) [16]. Parmi ces mycobactéries :

Complexe *Mycobacterium avium* : comprend deux espèces génétiquement distinctes *M. avium* et *M. intracellulaire*. Ce dernier infecte surtout les patients immunocompétents. Quant à *M. avium*, il comprend trois sous-espèces correspond à des caractéristiques de pathogénicité et d'hôte, il s'agit de *M. avium subsp avium*, essentiellement un pathogène opportuniste chez les patients atteints de SIDA où il est responsable d'infections disséminées [33] et rencontré aussi chez les oiseaux, mais également chez les suidés, les primates, certains cervidés [57]. *M. avium subsp paratuberculosis*, agent responsable de la maladie de Johne chez les ruminants et probablement associé à la maladie de Crohn chez l'homme et *M. avium subsp silvaticum*, un pathogène aviaire qui peut causer l'entérite chez les veaux [33].

Mycobacterium gordonae : est responsable de thélite nodulaire tuberculoïde de la vache laitière [16].

Mycobacterium marinum : est un pathogène des poissons et autres animaux aquatiques (crustacés, amphibiens, mollusques etc.). La contamination de l'homme s'effectue à travers de lésions cutanées au contact avec d'animaux ou d'eaux infectés (aquariums, piscines, lacs, rivières) [102]. Les professionnelles de la filière pêche sont particulièrement exposés. Pour le reste de la population, le principal facteur de risque est aquariophilie et l'appellation « granulome des aquariums » est d'usage courant pour désigner la maladie due à *M. marinum*. Le terme « granulome des piscines », se rapportant à des épisodes épidémiques liés à l'exposition du public à l'eau des piscines contaminées [103] ;[104].

Mycobacterium ulcerans : est responsable d'une panniculite infectieuse nécrosante à l'origine de l'ulcère de Buruli. Il affecte majoritairement l'enfant et constitué une menace émergente pour la santé publique dans de nombreuses régions rurales inter tropicales humides [105].

1.4.1.2.2 Mycobactéries saprophytes (non pathogènes)

Elles sont très nombreuses dans la nature : eau, sol, herbe, tube digestif, peau, muqueuses, lait [16]. Elles ne sont pas habituellement pathogènes (très rarement responsables d'infection). Cette catégorie est composée de nombreuses espèces mycobactériennes, telles que *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. flavescens*, *M. goodii* etc. [106].

1.4.2 Classification selon la vitesse de croissance

En fonction de leur vitesse de croissance en conditions optimales de la culture [107] ; [108], le genre *Mycobacterium* est divisé en deux groupes, les mycobactéries à croissance rapide et les mycobactéries à croissance lente [109].

a) Mycobactéries à croissance rapide : ayant un temps de génération de l'ordre de 3 ou 4 heures et formant des colonies visibles en moins de 7 jours et étant aptes à se développer sur gélose nutritive [109].

b) Mycobactéries à croissance lente : ayant un temps de génération de l'ordre de 20 heures [109] et ne formant des colonies qu'après au moins de 7 jours de culture et étant incapables de se développer sur milieux bactériologiques standards [110].

Les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* sont toutes des mycobactéries à croissance lente avec un temps de génération élevé, de 14 à 15 heures pour *M. tuberculosis* et environ 20 heures pour *M. bovis*.

Les mycobactéries non tuberculeuses regroupent des mycobactéries à croissance rapide et à croissance lente avec un temps de génération extrêmement variables, allant de 2 heures pour les bactéries à croissance rapide comme *M. smegmatis* à 21 heures pour celles à croissance lente comme *M. aurum*, voire 7 jours pour *M. avium subsp para-tuberculosis* [111].

Cette différence phénotypique entre ces deux groupes correspond à une réelle division du genre *Mycobacterium* sur le plan phylogénétique [109].

Par ailleurs, la classification de Runyon définit 4 groupes parmi les mycobactéries atypiques selon le temps de croissance (lente ou rapide) et la production de pigment [32].

Groupe I : les Photochromogènes sont les MNT avec des colonies blanchâtres dans l'obscurité mais devenant pigmentées (jaunes ou oranges) lorsqu'on les expose quelques heures à la lumière [32]. Trois espèces importantes appartiennent à ce groupe, à savoir *M. kansasii*, *M. simiae* et *M. marinum* [112].

Groupe II : les scotochromogènes se caractérisent par une croissance lente et produisent un pigment jaune-orange à la lumière ou dans l'obscurité. Certains deviennent plus foncés avec l'exposition à la lumière [99]. Ils comprennent *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* et *M. gordonae* [112].

Groupe III : les non chromogènes ne sont pas pigmentés à la lumière ou à l'obscurité ou ne contiennent qu'un pigment jaune pâle, chamois ou beige qui ne s'intensifie pas après l'exposition à la lumière [99]. Ils comprennent *M. avium* et *M. intracellulaire*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. ulcerans* et *M. terrae* [112].

Groupe IV : les mycobactéries à croissance rapide (rapid growers) poussent en moins d'une semaine tout au moins lors du repiquage, la première culture pouvant prendre 2 à 3 semaines [113]. *M. chelonae* et *M. fortuitum* sont les agents les plus pathogènes chez l'homme dans ce groupe [112].

1.4.3 Classification par analyse du génome (phylogénie)

Les méthodes basées sur l'étude du génome sont devenues la référence en matière de taxonomie et d'identification. Les premières études ont établi le pourcentage d'homologie de l'ADN entre les différentes espèces de mycobactéries afin de déterminer leur proximité taxonomique [114]. Au début des années 1990, on a découvert que le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (16S rDNA) était à la fois un gène hautement conservé, commun à tous les êtres vivants, mais aussi un moyen de différencier les mycobactéries au niveau de l'espèce [115]. La phylogénie basée sur le polymorphisme de 16S rDNA permet de mettre en évidence trois grands groupes en fonction de leur vitesse de croissance, un groupe des mycobactéries à croissance lente, des mycobactéries à croissance intermédiaire et les mycobactéries à croissance rapide [116].

1.5 Morphologie

Les mycobactéries sont définies comme des bacilles droits légèrement incurvés (Cf. Figure 1.2), mesurent entre 0,2 à 0,6µm de diamètre sur 1 à 10µm de

longueur. Elles sont immobiles, non sporulées, parfois ramifiées [107]. La morphologie de ces bacilles dans les échantillons cliniques est très variable et est affectée par un traitement antimicrobien antérieur [117]. La visualisation microscopique montre qu'elles sont généralement groupées formant ainsi une chaîne, un filament ou ramifiées en forme X, Y ou V [118]. Elles sont liées phylogénétiquement aux bactéries à Gram positif, même si leur coloration de Gram est souvent faible ou variable [106].

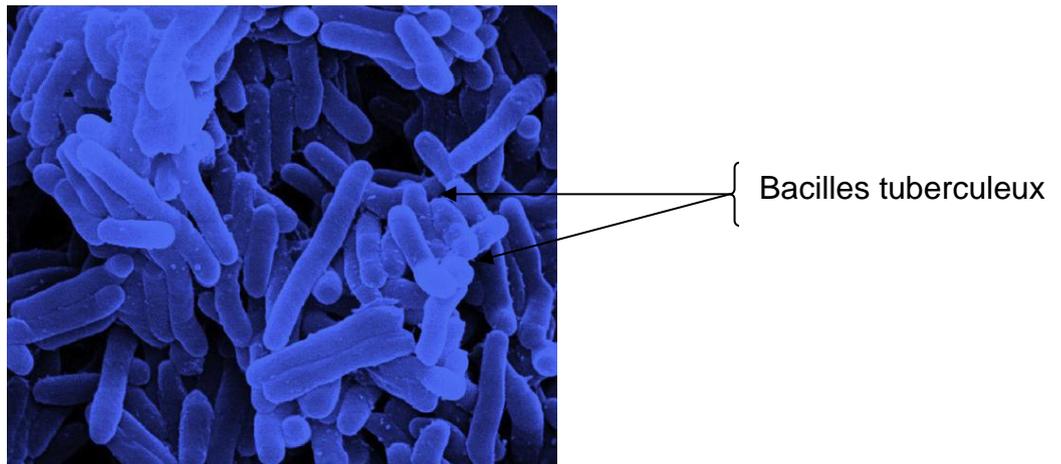


Figure 1.2: Aspect morphologique des mycobactéries au microscope électronique à transmission (Bacilles minces en forme de bâtonnets, de 1 à 10 μm de longueur et de 0,2 à 0,6 μm de largeur) [54].

Toutes les bactéries de l'ordre des *Actinomycetales* y compris les mycobactéries possèdent une propriété tinctoriale particulière : elles ne se décolorent pas sous l'action combinée d'un acide fort et de l'alcool et sont ainsi qualifiées d'Acido-alcool-résistantes (A.A.R). Cette propriété est liée à la structure de leur paroi cellulaire [16].

La paroi cellulaire mycobactérienne est une structure complexe nécessaire à la croissance cellulaire, à la résistance aux antibiotiques et à la virulence des bacilles. Elle est composée d'une membrane plasmique qui est importante pour maintenir l'équilibre osmotique et réguler le transport de solutés spécifiques entre le cytoplasme et l'environnement. La membrane et l'espace périplasmique sont entourées d'une paroi cellulaire riche en lipides (plus de 60% du poids de la paroi). Elle fournit un support mécanique, une propriété de mise en forme et une intégrité

structurale à la bactérie [119]. Les trois principaux composants de la paroi cellulaire sont le peptidoglycane, les lipopolysaccharides (arabinogalactane, lipoarabinomannane et lipomannane) et la membrane externe. Cette dernière contient des acides mycoliques et divers glycolipides [120]. Les acides mycoliques se trouvent liés de manière covalente à la partie arabinose du complexe arabinogalactane formant ainsi le feuillet interne de la mycomembrane, mais peuvent être également trouvés sous forme libre ou lié de manière non covalente à d'autres saccharides pour former le tréhalose mono-mycolate (TMM) et le dimycolate (TDM) appelés également « Cord Factor » (feuillet externe de la mycomembrane) (Cf. figure 1.3). La capsule forme la couche la plus externe et est composée principalement de protéines et de polysaccharides. Les couches riches en lipides et en glucides de la paroi cellulaire servent non seulement de barrière de perméabilité, offrant une protection contre les molécules hydrophiles, mais sont également essentielles à la pathogénèse et à la survie des mycobactéries [121].

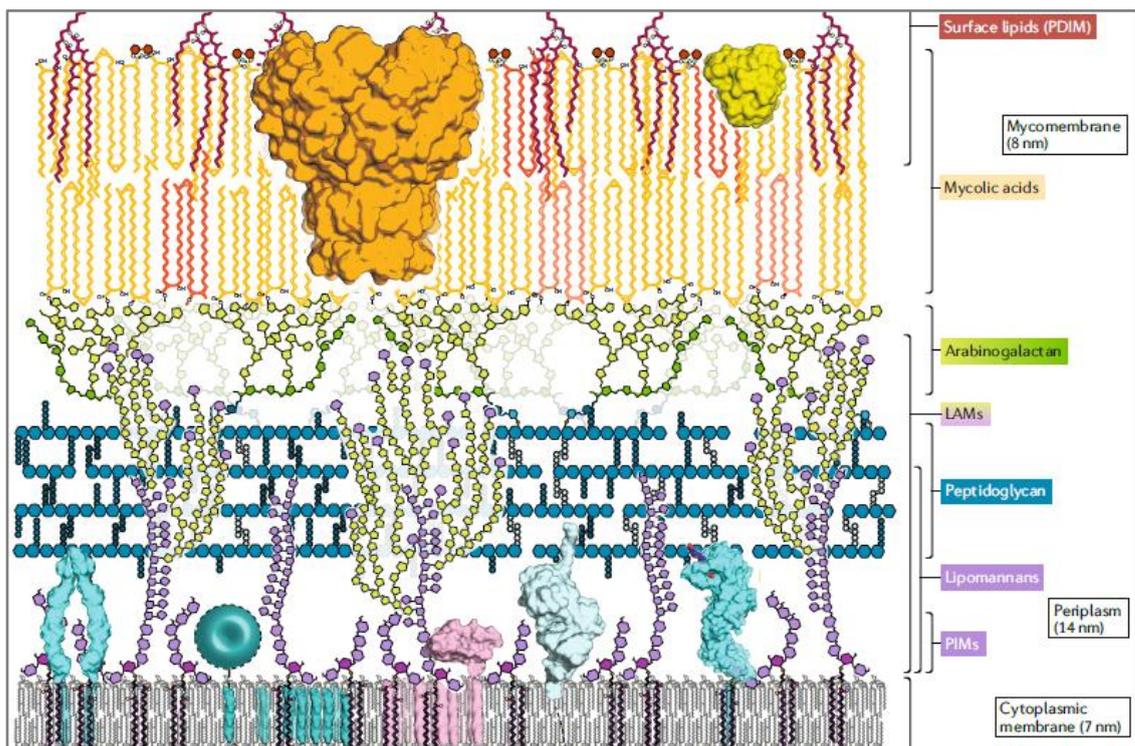


Figure 1.3: Structure schématique de la paroi cellulaire des mycobactéries [122].

1.6 Génome

Le génome des mycobactéries se présente sous forme d'un chromosome unique circulaire. Les espèces CMT partagent 99,9 % de similarité au niveau nucléotidique et leurs séquences d'ARN ribosomique 16S sont totalement identiques. Cette extrême similarité témoigne d'une origine commune [53], cependant certaines régions sont hautement polymorphes, soit par une variation en nombre et / ou en position, soit par une variation de structure primaire. Ces zones de polymorphisme semblent correspondre essentiellement à des segments de gènes codant pour des protéines dont la variabilité offre un avantage sélectif aux bactéries (gènes de résistance aux antituberculeux, gènes codant pour des protéines antigéniques impliquées dans l'échappement à la réponse immunitaire etc.) ou à des séquences non codantes, telles que les séquences d'insertion ou séquences répétées. Les structures polymorphes sont concernées par les techniques de typage moléculaire des mycobactéries [123].

Dans le cas de *M. tuberculosis*, le génome entier de *M. tuberculosis* H37Rv, une souche de référence largement utilisée, a été complètement séquencé en 1998. Cette analyse a relevé que le génome de cette souche contenait 4 411 529 paires de bases (pb) et environ 3989 gènes. Il a une teneur élevée en guanine + cytosine (G+C) d'environ 65.6% [124]. Le séquençage a conduit à prédire que 3 924 gènes codent pour des protéines, dont 10% codent pour les protéines de la famille PE et PPE [124];[125]. Ces protéines ont un rôle important dans la survie de *M. tuberculosis* grâce à la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte mais également elles ont un effet immunogène qui peut servir à la production des nouveaux vaccins antituberculeux [126]; [127].

Le génome de la souche de *M. bovis* contenait 4 345 492 pb [128]. Ce génome se diffère de celui de *M. tuberculosis* par délétion génétique, ce qui entraîne des différences dans l'expression et la régulation des gènes entre les deux espèces. La principale différence réside dans les gènes codant pour les lipides de la paroi cellulaire, les protéines antigéniques sécrétées et les protéines PE de la paroi cellulaire. Ces dernières peuvent déterminer les différences de tropisme d'hôtes mammifères pour les deux espèces [129]. De plus, il existe des défauts dans plusieurs gènes de *M. bovis* impliqués dans le métabolisme des glucides y compris

ceux responsables de la phosphorylation du glucose et de la formation du pyruvate [117].

1.7 Biologie

1.7.1 Caractères cultureux

Les mycobactéries sont des aérobies, bien que quelques espèces notamment *M. bovis*, se développent mieux dans des conditions de faible concentration en oxygène [117]. La vitesse de croissance est très variable, les membres CMT ont une croissance lente avec un temps de génération élevé (de 20 à 24 heures pour *M. tuberculosis*) [130], par conséquent les cultures se développent dans environ deux semaines jusqu'à six à huit semaines [131]. La plupart des mycobactéries ont des besoins nutritionnels simples et sont capables d'utiliser une gamme de sucres et d'acides organiques comme sources de carbone (ex. le glycérol pour *M. tuberculosis* et le pyruvate sodique pour *M. bovis*) et divers amides et acides aminés comme sources d'azote (ex. l'asparagine, la glutamate, l'alanine et l'aspartate) [117]. Les conditions optimales pour la croissance sont une température de 37°C pour les espèces appartenant aux CMT, alors que les MNT peuvent se multiplier dans un large éventail de températures allant de 4°C pour *M. psychrotolerans* [111] à plus de 45°C, voire à 52°C pour *M. thermotolerans* et *M. phlei* [132], un pH de 6,8 à 7, une pression de CO₂ de 5 à 10% [131].

1.7.2 Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques permettent le diagnostic différentiel des espèces au sein du CMT. L'étude des caractéristiques biochimiques repose sur la mise en évidence des activités biochimiques tels que la production de niacine et la présence de la nitrate réductase, et d'épreuve de croissance en présence de différentes substances tels que pyruvate, hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxilique (TCH), thiosemicarbazone (Tb1) et pyrazinamide et D-cyclosérine [133].

1.7.3 Résistance aux agents physico-chimiques

Les mycobactéries sont sensibles à la chaleur (détruites après une exposition de 20 minutes à 60 C°, 20 secondes à 75 C°), aux rayons ultra-violet, à l'iode, à l'alcool, aux dérivés phénoliques, aux hypochlorites et au formol. Le bacille

tuberculeux est néanmoins sensible à certains médicaments (traitement de la tuberculose humaine) [16].

En revanche, elles résistent bien au froid (+4 C°), et à la dessiccation. Les mycobactéries sont beaucoup plus résistantes que les bactéries usuelles aux antiseptiques et désinfectants chimiques, elles résistent aux acides et aux bases en solution, aux antibiotiques usuels [16].

Les mycobactéries peuvent survivre dans l'environnement dans des conditions que la plupart des autres bactéries sont incapables [134]. Dans le cas de *M. bovis*, la durée de la survie est variable selon la charge bactérienne dans l'excrétions et les conditions climatiques (température, humidité et exposition aux ultra-violets) [51], elle est variée entre 18 à 332 jours à une température de 12 à 24°C (selon l'exposition au soleil) [135]. Ce bacille peut également survivre entre 2 et 6 semaines dans des lésions tuberculeuses macroscopiques de poumons et nœuds lymphatiques des bovins [136]. Des résultats similaires sont observés pour les échantillons d'urine (3 jours en été et 28 jours en hiver) et sécrétions bronchiques (7 jours en été et 70 jours en hiver) [137]. Mais sa survie peut être prolongée jusqu'à 58 jours dans l'eau contaminée, et jusqu'à 2 ans dans les excréments couverts. Par ailleurs, *M. tuberculosis* est relativement résistante à la chaleur dont la durée de vie est 2 heures dans environnement exposé au soleil [138]. Les bacilles tuberculeux peuvent conserver leur virulence après l'excrétion en dehors de l'hôte. Ghodbane et al. (2014) a démontré que *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. canetti* conservaient leur virulence après un séjour de 12 mois dans le sol [139].

L'une des caractéristiques des mycobactéries est le développement des stratégies de la survie à l'intérieur de l'hôte qui peuvent également utilisées en dehors de l'hôte. Parmi ces stratégies on cite :

- Etat de dormance

La dormance est définie comme un état fonctionnel réversible des cellules bactériennes, caractérisée par une activité métabolique réduite et un arrêt de la division cellulaire. Cette transformation est une réponse aux conditions environnementales défavorables à une croissance normale [140].

- Formation de biofilms

Dans les matrices environnementales, la paroi hydrophobe des mycobactéries leur permet d'adhérer fortement aux particules en suspension dans l'eau, aux sédiments ou encore aux surfaces favorisant ainsi la formation de biofilms [141]. Cette organisation des mycobactéries leur confère une résistance accrue vis-à-vis des conditions défavorables dans l'environnement [142]. Il a été démontré que *M. tuberculosis* forme des biofilms, mais le rôle de ces biofilms dans l'infection a été peu étudié [143].

- Interactions avec la faune de sol

Les mycobactéries environnementales et pathogènes y compris *M. bovis* sont capables de survivre et multiplier dans les kystes d'amibes [144] ; [145] ; [146]. La localisation intra-amibienne des mycobactéries les protège des conditions environnementales défavorables, des biocides tels que le chlore [144] ; [147], des antibiotiques [148], et favorise leur dissémination et leur implication potentielle dans des maladies humaines [146].

1.7.4 Virulence

La virulence des mycobactéries semble être due bien plus aux interactions immunitaires entre le bacille et l'hôte qu'aux propriétés toxiques des bacilles [130]. Elle implique donc un ensemble de mécanismes complexes et variés faisant intervenir de nombreux gènes et protéines permettant notamment au bacille de pénétrer dans les cellules de l'hôte et d'y survivre en bloquant les différents mécanismes de défense des macrophages [149].

Les bacilles tuberculeux possèdent des constituants de la paroi cellulaire nécessaires pour accéder au milieu intracellulaire, mais également de nombreuses protéines et enzymes essentielles à l'inhibition de la phagocytose [40]. La paroi cellulaire renferme beaucoup de facteurs de virulence, dont certains réduisent l'immunité à l'intérieur des cellules et participe à la persistance de ces bactéries dans l'hôte [150].

- Lipomannane joue un rôle dans la modulation de la réaction immunitaire de l'hôte. Il provoque une induction d'IL-12 et finalement la mort cellulaire des macrophages [151].

- Lipoarabino-mannanes (LAM) ont été impliquées comme facteur de virulence de *M. tuberculosis*. Elles possèdent des fonctions modulatrices de la résistance bactérienne et du système immunitaire de l'hôte [152]. Elles provoquent la déphosphorylation de la tyrosine kinase et inactive l'activité kinase et éventuellement les fonctions des lymphocytes T et des cellules phagocytaires telles que les macrophages [153]. Elles bloquent également la maturation phagosomale, processus durant laquelle le phagosome interagit avec les endosomes et les lysosomes pour la destruction des bactéries [150]. Le *Cord Factor* protège les bacilles dans les macrophages en réduisant l'efficacité des antibiotiques et inhibant la réponse immunitaire [154]. Ces rôles incluent l'inhibition de la fusion et acidification de la phagosome-lysosome mais également induction des lésions tissulaires par stimulation de la libération des cytokines pro-inflammatoires tels que TNF α , IL-6 et IL-12 [155] ;[156] ;[157].
- Sulfolipides jouent un rôle dans l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome et empêchent ainsi la libération de superoxydes affectant la phagocytose et la sécrétion les cytokines [158].

CHAPITRE 2

EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE HUMAINE ET BOVINE

2.1 Epidémiologie descriptive

2.1.1 Situation épidémiologique mondiale de la tuberculose humaine

Selon le rapport annuel de l'OMS en 2020, 10 millions de personnes ont contracté la tuberculose (130 cas /10⁵ habitants) et 1,4 million de décès. Sur le plan géographique, la plupart des cas ont été enregistrés dans les régions de l'Asie du Sud-Est (44%), de l'Afrique (25%) et du Pacifique occidental (18%). Cependant, des proportions plus faibles sont survenues dans les régions de la Méditerranée orientale (8,2%), de l'Amérique (2,9%) et de l'Europe (2,5%) (Cf. Tableau 2.1). Huit pays représentaient deux tiers des cas notifiés se sont produits en Inde (26%), Indonésie (8,5%), Chine (8,4%), Philippines (6%), Pakistan (5,7%), Nigéria (4,4%), Bangladesh (3,6%) et Afrique du Sud (3,6%). Ces pays et 22 autres pays figurant sur la liste de l'OMS des 30 pays où la charge de la tuberculose est élevée représentaient 86 % des cas dans le monde [3].

Tableau 2.1: Estimation de l'incidence mondiale de la tuberculose humaine en 2019 [3].

Continent	Incidence (Nbr ×10 ³)
Afrique	2 470 (2 190-2 750)
Amériques	290 (269-311)
Méditerranée Orientale	819 (646-1 010)
Europe	246 (215-281)
Asie du Sud-Est	4 340 (2 460-5 320)
Pacifique occidental	1 800 (1 480-2 150)
Total	9 960 (8 940-11 100)

Le taux d'incidence variait considérablement d'un pays à l'autre. En 2019, 54 pays avaient une faible incidence de tuberculose (moins 10 cas pour 10⁵ habitants par an), principalement dans la Région OMS des Amériques et de l'Europe, ainsi

que dans quelques pays des régions de la Méditerranée orientale et du Pacifique occidental. Il y avait 150 à 400 cas pour 10^5 habitants dans la plupart des 30 pays à forte charge de tuberculose et plus de 500 cas en République centrafricaine, en République populaire démocratique de Corée, au Lesotho, aux Philippines et en Afrique du Sud (Cf. figure 2.1) [3].

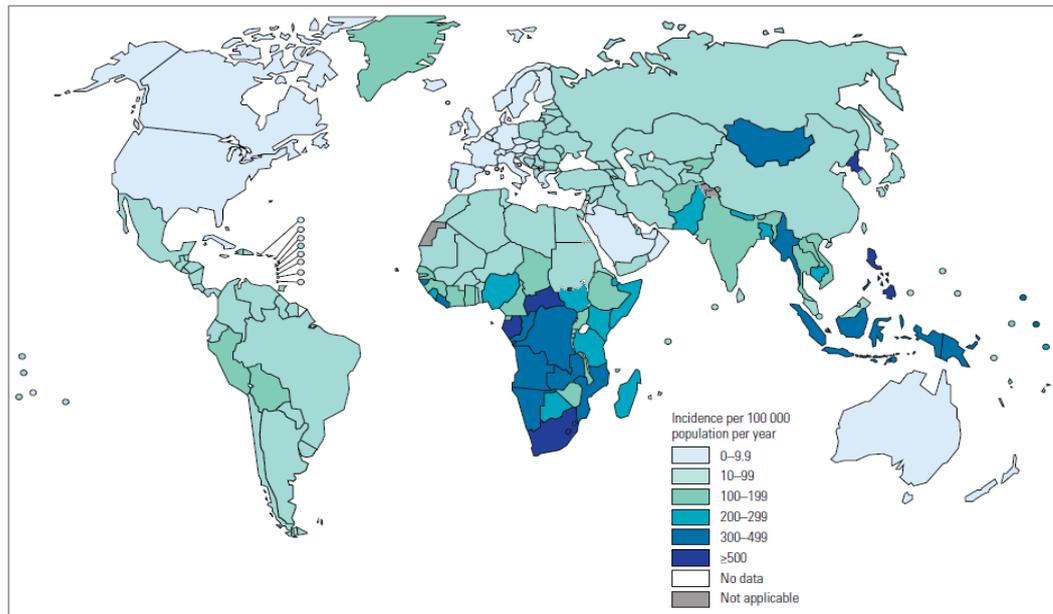


Figure 2.1 : Estimation du taux d'incidence de la tuberculose humaine (incidence/ 10^5) pour l'année 2019 [3].

2.1.1.1 Situation épidémiologique de la tuberculose humaine en Algérie

En Algérie, la situation épidémiologique a évolué en plusieurs étapes, suivant le développement des conditions socioéconomiques et l'amélioration de la prise en charge médicale des cas. Avant l'indépendance, l'incidence de la tuberculose était estimée de 300 cas pour 10^5 habitants. Au lendemain de l'indépendance et jusqu'à la fin des années 80, il y a eu une réduction considérable du risque annuel de l'infection (20 à 99 cas/ 10^5).

À partir de 1990, la courbe de l'évolution de la tuberculose connaît une stagnation puis une augmentation de l'incidence qui peut atteindre 60 cas/ 10^5 habitants. Cette période est marquée par les déplacements de populations vivant dans les zones rurales reculées et l'insécurité empêchant les visites de supervision. Dans la même période, l'incidence annuelle des cas de tuberculose extrapulmonaire déclarés augmente, rejoignant la courbe d'incidence des cas de

tuberculose pulmonaire à microscopie positive. Cette augmentation est liée probablement à l'évolution de la primo-infection tuberculeuse, traduisent à la fois l'intensité de la transmission du bacille dans la population jeune et l'amélioration progressive de la couverture sanitaire de la population.

À partir de l'année 2000, la relance des activités du programme antituberculeux a permis de constater une régression de l'incidence des cas de tuberculose pulmonaire contagieuse qui décline au-dessous du seuil de 17 cas pour 10^5 habitants en 2016. Durant ces dernières années, l'incidence annuelle des cas de tuberculose extra pulmonaire déclarée augmente rapidement et dépassant celle de la tuberculose pulmonaire (Cf. figure 2.2) [159].

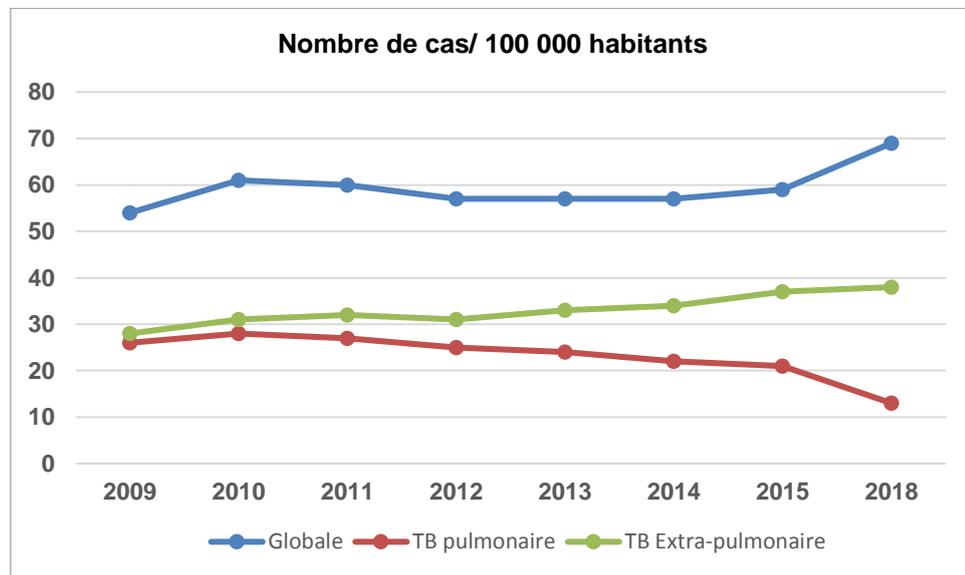


Figure 2.2 : Evolution du taux d'incidence de la tuberculose humaine en Algérie [4] ;[159].

2.1.2 Situation épidémiologique mondiale de la tuberculose bovine

La répartition géographique de la tuberculose bovine a radicalement changé ces dernières décennies. Avant l'introduction des mesures de contrôle et la pasteurisation du lait dans les pays développés, la tuberculose étaient largement répartie à travers le monde [18]. Après la mise en place de ces mesures sanitaires, on retrouve un gradient Nord/Sud où les prévalences les plus fortes sont rapportées dans les pays en développement (Afrique, Amérique Centrale et sud, certains pays de l'Asie et le moyen d'orient) [160].

Selon le rapport de l'Office international d'Épizooties (OIE), sur 188 pays ayant signalé leur statut sanitaire vis-à-vis la tuberculose bovine, 44% (82 pays) ont déclaré la présence de la maladie chez les animaux domestiques et sauvages durant l'année 2017-2018 (Cf. figure 2.3) [161]. En Afrique, 30 sur 59 pays ont rapporté la présence de la tuberculose bovine durant la période 2015-2017 [162] ; [163].

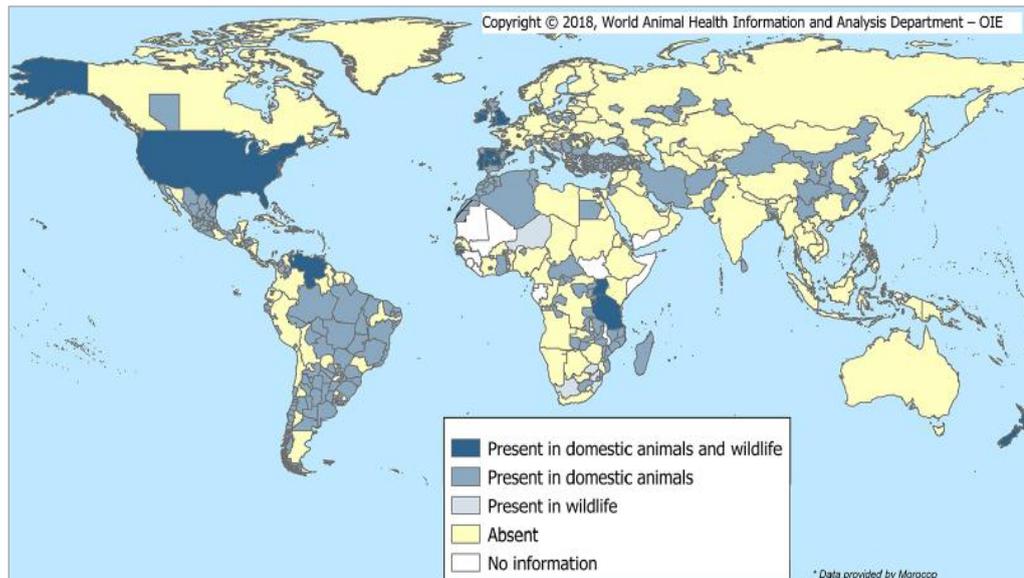


Figure 2.3: Répartition géographique de la tuberculose bovine chez les animaux domestiques et sauvages dans le monde durant la période du janvier 2017 au juin 2018 [161].

Dans les pays en développement, les données sur la prévalence de la tuberculose bovine sont rares, et l'information disponible ne représente pas forcément la situation épidémiologique réelle de la maladie, en raison de manque d'un système efficace de surveillance et de notification [164]. Sur 55 pays africains et 36 pays asiatiques, seuls sept pays africains et sept pays asiatiques appliquent des mesures adéquates de la surveillance et la lutte contre la maladie, les 77 pays restants contrôlent la maladie de manière inadéquate ou pas du tout [165]. La plupart des données disponibles sur la prévalence de l'infection à *M. bovis* chez le bovin en Afrique proviennent de l'inspection *post-mortem* au niveau des abattoirs. Cette prévalence est variable d'une zone géographique à l'autre (de <1% à > 10%) (Cf. Tableau 2.2) [166].

Bien que dans certaines parties des pays d'Amérique latine et des Caraïbes, des progrès significatifs aient été réalisés dans la lutte contre la tuberculose bovine et que des taux d'infection inférieurs à 1% aient été signalés pour 30% des bovins de la région, 70% des bovins sont élevés dans des zones où les taux d'infection sont plus élevés (une prévalence de troupeau allant jusqu'à 56%) [167] ; [168].

Tableau 2.2 : Aperçu sur certains rapports sur les prévalences de la tuberculose bovine estimées par l'inspection *post-mortem* dans différents pays africains.

Pays	Région	Période d'étude	Prévalence %	Références
Burkina Faso	Centre/ Sud-Ouest	2011	6,74 (101/1,499)	[169]
Cameroun	Nord-Ouest	2013	8,8 (207/2,346)	[170]
Egypte	Nord-Est (Ismailia)	2010	0,6 (86/13,866)	[171]
Éthiopie	Sud	2006-2007	10,2 (337/3,322)	[166]
Ghana	Sud (Accra)	2009	5 (145/2,886)	[172]
Érythrée	Centre (Asmara)	2014-2015	0,05 (15/26,603)	[173]
	Sud	2007	1,8 (60/3,330)	[174]
Mali	Sud	2008-2010	11,7 (79/675)	[175]
Maroc	Nord-Ouest (Rabat)	2014-2015	3,7 (327/8,658)	[176]
Niger	Ouest (Niamey)	2007-2008	0,19 (819/432,764)	[177]
	Nord (Bauchi)	ND	15 (120/800)	[178]
	Nord-Ouest	2014	6,1 (226/3,690)	[179]
Nigéria	Sud-Ouest	ND	11,3 (46/408)	[180]
Rwanda	Centre (Kigali)	2009	0,9 (148/16,753)	[181]
Sud d'Afrique	Sud-Ouest (Est cape Province)	ND	2,5 (376/14,950)	[182]
Soudan	Ouest (Sud Darfur)	2007-2009	6 (400/6680)	[183]
Tchad	Centre-Ouest (N'Djamena)	2002	7,3 (727/10,000)	[184]
Ouganda	Centre (Mubende)	2013-2014	9,7 (153/1,576)	[185]
Zambie	Sud	2004	14,1 (98/695)	[186]

ND : Non déterminé.

2.1.2.1 Situation épidémiologique de la tuberculose bovine en Algérie

L'Algérie est un pays endémique de la tuberculose bovine et les foyers sont repartis sur le territoire nationale [5]. Malgré la mise en place d'un système de surveillance, la situation épidémiologique de la maladie reste méconnue et la plupart des données publiées proviennent des études à des fins de recherche [187]. Des investigations anatomopathologiques, sérologiques, bactériologiques et moléculaires ont été effectuées dans différentes régions du pays. Ces études ont pu estimer la prévalence de la tuberculose bovine et identifier les souches responsables de la maladie (Cf. Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Prévalence de la tuberculose bovine dans quelques wilayas de la région Centre et Est algérien.

Région d'étude	Période d'étude	Technique d'analyse	Prévalence (%)	Références
Alger + Blida	2007	IP+ Bactériologie+ Biomol	3,6	[5]
Béjaia	2009-2018	IP	0,007	[188]
Jijel	2017-2018	IP	1,2	[189]
Sétif + M'Sila + Constantine	2018-2019	Sérologie (ELISA)	3,5	[187]

IP : Inspection *post-mortem* ; **Biomol** : Biologie moléculaire.

Dans les pays du Nord, la tuberculose liée à *M. bovis* est un problème de la santé animale presque sous contrôle [55], la majorité des pays en Europe et en Amérique du Nord, ainsi que l'Australie, sont indemnes de la maladie ou proches de son éradication complète chez le bétail [164]. Actuellement, 18 pays d'Europe (Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Estonie, Finlande, France, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Hongrie, Malte, Pays-Bas, Pologne, République Tchèque, Slovaquie, Slovénie, Suède) ont le statut de pays officiellement indemnes, et trois autres en partie (Royaume-Uni : Ecosse et île de Man ; Italie : 14 régions ; Portugal : région de l'Algarve ; Espagne : île des Canaries) [16].

Cependant, le maintien de *M. bovis* chez les espèces sauvages a considérablement compromis les efforts d'éradication dans certains pays comme l'Irlande, la Nouvelle-Zélande, le Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord et dans certaines parties des États-Unis d'Amérique [164].

2.1.3 Situation épidémiologique de la tuberculose zoonotique

La tuberculose zoonotique est répartie dans le monde entier et en particulier en Afrique [190].

L'incidence de la tuberculose humaine due à *M. bovis* varie considérablement d'un pays à l'autre, en fonction de la prévalence de la maladie chez les bovins, des conditions socio-économiques, des habitudes de consommation et des pratiques d'hygiène alimentaire [18]. En 2019, il a été estimé que 140 000 nouveaux cas de tuberculose zoonotique ont été signalés chez des personnes et 11 400 décès dus à la maladie dans le monde, et la plupart des cas sont survenus en Afrique (Cf. Tableau 2.4) [3].

Tableau 2.4 : Estimation de l'incidence et la mortalité de la tuberculose humaine due à *M. bovis* dans différents continents pour l'année 2019 [3].

Continent	Incidence	Mortalité
Afrique	68 900	8 440
Amériques	870	42
Méditerranée Orientale	8 190	604
Europe	986	65
Asie du Sud-Est	43 400	2 020
Pacifique occidental	18 000	270
Total	140 000	11 400

À l'échelle mondiale, seuls 16 pays ont signalé la détection de *M. bovis* chez des patients atteints de tuberculose, dont un seul (Afrique du Sud) était un pays à forte charge de tuberculose [191]. Les données disponibles sur la tuberculose zoonotique ne représentent pas avec précision l'incidence réelle de cette maladie, en raison de l'absence d'une surveillance systématique de la tuberculose bovine chez l'homme dans les pays en développement où la tuberculose bovine est endémique et l'incapacité des procédures de laboratoire les plus couramment utilisées pour diagnostiquer la tuberculose humaine afin d'identifier et de différencier *M. bovis* de *M. tuberculosis* [9] ;[10] ; [165] ;[192] ; [193]. La plupart des données publiées sur la tuberculose zoonotique proviennent d'études qui ne sont généralement pas basées sur des données représentatives au niveau national.

Malgré les limites en matière de représentativité des données, la proportion des cas rapporté dans certains études est préoccupante [10] (Cf. Tableau 2.5).

Dans les pays en développement, certains rapports ont spéculé que *M. bovis* représentait 10 à 15% des cas de tuberculose chez l'homme [165], tandis que selon d'autres estimations cette infection ne représenterait que 0,4 à 8% des cas [194]. En Afrique, *M. bovis* pourrait être responsable de 37,7% de tous les cas de tuberculose humaine et environ 70 000 des cas sont survenus annuellement [10].

Tableau 2.4 : Aperçu sur les études ayant rapportées l'isolement du *M. bovis* chez l'homme dans certains pays d'Afrique.

Pays	Région	Type d'échantillon	Technique d'analyse	Période d'étude	Prévalence % de TBz	Références
Ethiopie	Nord-Ouest	Aspiration NL	Biomol	ND	5 (2/40)	[195]
	Sud	Aspiration NL+	Biomol	2006-2010	0,6	[196]
	Nord	Aspiration NL+ Crachat	Biochimie	2007-2008	14,9 (8/57)	[197]
	Centre	Aspiration NL+	Biomol	2013	1,4 (1/74)	[198]
Nigéria	Nord	Crachat	Biochimie	ND	15,4 (10/65)	[199]
	ND	Crachat	Biomol	2010-2011	0,3 (1/375)	[200]
	ND	Crachat	Biomol	2009-2010	0,9 (4/423)	[201]
Tunisie	Est (Sfax)	Biopsie et aspiration NL	Biomol Biochimie	2013	76 (60/79)	[202]
	Sud	EP	Biomol	2013-2015	76,8 (76/99)	[203]
Zambie	Sud	Crachat	Biomol	2011-2012	5,5 (2/33)	[204]
	Sud	Crachat	Biomol	2008/2011	0,86 (8/1017)	[205]
Burkina Faso	Centre/Sud-Ouest	Crachat	Biomol Biochimie	2009-2013	1,2 (7/576)	[169]
Ghana	Sud (Accra)	Crachat	Biochimie	2003	3,1 (2/64)	[206]
	Nord/Sud	Crachat	Biomol	2012-2014	0,9 (15/1,755)	[207]
Ouganda	Nord-Est (Karamoja)	Biopsie NL	Biomol	ND	7 (3/43)	[197]

TBz : Tuberculose zoonotique ; **NL** : Nœuds lymphatiques ; **EP** : Extra-pulmonaire ; **ND** : Non déterminé ; **Biomol** : Biologie moléculaire.

Dans les pays développés, *M. bovis* représente généralement une part insignifiante de l'ensemble des cas de tuberculose chez l'homme. Elle provoque moins de 2% de tous les cas de tuberculose aux États-Unis d'Amérique [208], et provoquerait moins de 1,5% des cas humains confirmés au Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord [6]. Aux Pays-Bas, l'infection à *M. bovis* a représenté environ 1,4% de tous les cas de tuberculose entre 1993 à 2007 [209].

2.2 Epidémiologie analytique

2.2.1 Transmission (Voie, mode et source)

Chez le bovin, l'inhalation est la voie d'infection la plus courante, provoquant des lésions du nasopharynx et des voies respiratoires inférieures, y compris les poumons et les nœuds lymphatiques satellites [210] ;[211]. En revanche, l'ingestion de *M. bovis* provenant de pâturages, d'aliments ou d'eau contaminés par des sécrétions muqueuses ou nasales, des matières fécales ou de l'urine contenant le bacille tuberculeux, provoquant généralement des lésions des ganglions lymphatiques mésentériques [212] et peu ou pas de lésions visibles sur la paroi intestinale [213].

D'autres voies d'infection, telles que transplacentaire, génitale ou intra-mammaire, sont désormais rares.

- La transmission transplacentaire au fœtus résulte probablement d'une endométrite tuberculeuse et conduit à la formation du complexe primaire dans le foie et / ou dans les ganglions lymphatiques portes. Les veaux nés avec des infections congénitales développent généralement une tuberculose généralisée au cours des premières semaines ou des premiers mois de leur vie [213] (environ 1,2% des veaux nés de mères tuberculeuses susceptibles d'être infectés congénitalement) [214].
- La transmission vénérienne peut se produire si la tuberculose bovine est établie dans les organes génitaux.
- La tuberculose mammaire est généralement transmise par voie iatrogène d'une vache à l'autre par le biais de traitements intra-mammaires. La tuberculose chez les veaux était souvent une conséquence de la présence de *M. bovis* dans le lait maternel [212] ;[215] ; [216].

Chez l'homme, l'infection tuberculeuse est contractée généralement par inhalation d'un ou plusieurs bacilles tuberculeux émises par un patient-source atteint de tuberculose pulmonaire ou laryngée, particulièrement lors d'un effort de toux, d'éternuement, ou de vocalisation. Ces bacilles se trouvent dans des particules aériennes suffisamment petites (1 à 5 μm), appelées gouttelettes de Pflügge, qui sèchent rapidement dans l'air, mais peuvent rester en suspension dans une pièce non aérée pendant environ 30 min [217]. Dans les cas rares, la transmission se produit par contact direct avec des liquides organiques infectés (ex. urine, drainage d'un abcès tuberculeux) ou par l'intermédiaire d'un matériel contaminé (ex. seringues, sonde de lavage gastrique ou bronchoscope etc.) [218] ;[219] ; [220].

Les enfants atteints de tuberculose pulmonaire ont des sécrétions endo-bronchiques pauci-bacillaires et une force de toux réduite, et ils infectent donc rarement les autres [221] ;[222]. Cependant, les adolescents atteints de tuberculose pulmonaire réactivée ont une charge bacillaire plus importante et une toux plus forte, ils peuvent être une source importante des bacilles [223] ; [224].

L'infection de l'homme par *M. bovis* peut se reproduire par voie aérienne fait suite d'un contact étroit avec des bovins infectés [225]. Ce mode de transmission est le plus courant pour les éleveurs, les vétérinaires, les ouvriers d'abattoir [226] ;[227] ;[228], qui peuvent développer une tuberculose pulmonaire et mettre à leur tour en danger d'autres personnes et d'animaux [229] ; [230], ou indirectement par ingestion du lait infecté non pasteurisé et/ou des viandes ou produit carnés provenant du bovin infecté [165] ;[230-233], ou par inoculation accidentelle à laquelle sont exposés ceux qui manipulent des lésions tuberculeuses (inspecteurs et ouvriers d'abattoirs).

La transmission interhumaine de *M. bovis* est possible mais peu de cas ont pu être vraiment confirmé. Comme dans la plupart des zoonoses, l'homme n'est généralement qu'un hôte accidentel de *M. bovis* et l'infection dépend de la source animale [234].

2.2.2 Conditions d'infection et les facteurs de risque

2.2.2.1 Pour l'homme

Le contact de l'homme avec les agents pathogènes y compris le bacille tuberculeux est nécessaire mais pas suffisant pour le développement des maladies. Les facteurs tenant à l'hôte (intrinsèques) et facteurs environnementaux (extrinsèques), jouent un rôle crucial dans l'infection et le développement des signes cliniques [235] ; [236].

2.2.2.1.1 Facteurs intrinsèques

Les facteurs liés à l'hôte jouent un rôle important dans l'immunité innée à la tuberculose [237].

- Prédisposition génétique

Les facteurs génétiques de l'hôte jouent un rôle important dans la modulation des réponses immunitaires à *M. tuberculosis* et dans la progression clinique de la tuberculose [238]. Des études sur la sensibilité mendélienne aux maladies mycobactériennes (MSMD, Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases) ont abouti à l'identification de multiples mutations monogéniques rares dans les gènes codant pour les protéines de la voie IL12 et IFN- γ , augmentant la sensibilité aux maladies mycobactériennes [239] ; [240]. Ces mutations ont été identifiées dans sept gènes autosomaux (IFNGR1, IFNGR2, IL12B, IL12RB1, STAT1, IRF8, ISG15) et deux gènes sur le chromosome X (NEMO, CYBB) [241-243]. D'autres études ont indiqué que les polymorphismes des gènes TLR, KIR, VDR, ASAP1, AGMO, FOXP1 et UBLCP1 ont des effets sur le phénotype de la maladie, mais aussi sur l'issue du traitement antituberculeux [238].

- Age

L'âge a une influence sur la sensibilité à la tuberculose. Les enfants jusqu'à l'âge de 5 ans sont très sensibles, en particulier à la tuberculose disséminée et à la méningite tuberculeuse. Ceux entre l'âge de 5 ans et le début de la puberté semblent relativement résistants. Dans les pays en développement, la grande majorité des cas surviennent entre 15 et 59 ans [244].

- Sexe

Des enquêtes menées dans plusieurs pays montrent que plus d'hommes que de femmes reçoivent un diagnostic de tuberculose, mais il n'est pas clair si cela est dû à des différences liées au sexe, à des facteurs de mode de vie tels que le tabagisme ou à la capacité d'accéder aux soins de santé [244].

- Immunodépression

La co-infection par le Virus Immunodéficient Humain (VIH) est le facteur immunosuppresseur le plus puissant pour développer une tuberculose active [245]. Elle augmente considérablement les risques de réactivation de l'infection latente [246] et aboutit généralement à une dissémination généralisée provoquant une tuberculose extra-pulmonaire [247]. Ce risque est 6 à 26 fois supérieur à celui des sujets non infectés [248]. Le VIH entraîne une diminution de la population de lymphocytes CD4. Ces dernières produisent approximativement la moitié de la quantité d'interféron-gamma (INF- γ) indispensable à la formation et le maintien des granulomes tuberculeux matures [249] ;[250].

- Malnutrition

La malnutrition se caractérise par des carences nutritionnelles en éléments protéino-énergétiques associées à de carences de productions de cytokines indispensables à la coordination de la réponse immunitaire [251].

- Diabète

Les patients atteints de diabète sucré courent un risque plus élevé de passer d'une tuberculose latente à une tuberculose active [252]. Certaines études ont montré que les patients atteints de diabète sont plus susceptibles de développer une tuberculose multirésistante, bien qu'il n'y ait pas encore d'explication à cette association [253]. Environ 15% des cas de tuberculose dans le monde pourraient être liés au diabète [252]. Le diabète entraîne une sensibilité accrue à la tuberculose par le biais de plusieurs mécanismes, dont l'hyperglycémie et l'insulinopénie cellulaire, qui ont des effets indirects sur la fonction des macrophages et des lymphocytes [254].

- Tabagisme

De nombreuses études ont montré une association défavorable entre les épidémies mondiales de tuberculose et de tabagisme, l'exposition à la fumée de tabac ayant été associée à une infection tuberculeuse, une tuberculose active et une mortalité liée à la tuberculose [255]. Le rôle du tabac dans la pathogenèse de la tuberculose est lié à un dysfonctionnement de l'appareil muco-ciliaire et affaiblissement du système immunitaire, augmentant la sensibilité à l'infection par *M. tuberculosis* [256].

- Alcoolisme

La consommation de l'alcool a été reconnu comme un facteur de risque important de la maladie tuberculeuse [257], en raison de l'altération du système immunitaire, en particulier la modification des molécules de signalisation responsables de la production de cytokines [258].

Concernant la tuberculose zoonotique, le risque d'infection de l'homme par *M. bovis* est plus élevé dans certaines catégories professionnelles, notamment dans le secteur de l'élevage [259]. Les personnes à risque sont les éleveurs, les vétérinaires, les travailleurs des abattoirs, les marchands d'animaux, les gardiens de zoo, les trayeurs, le personnel d'autopsie, le personnel de laboratoire [260] ;[261].

2.2.2.1.2 Facteurs extrinsèques

Les facteurs environnementaux déterminent l'intensité et la durée de l'exposition d'un individu à d'autres personnes atteintes de tuberculose [244].

- Facteurs socio-économiques et comportementaux

L'urbanisation rapide observée dans les pays en développement et le statut socioéconomique (SSE) des individus ont une influence sur la sensibilité à l'infection [262] ;[263]. L'incidence de la tuberculose est généralement plus élevée dans les zones urbaines que dans les zones rurales [264]. Cette forte charge de la tuberculose dans les zones urbaines peut être due à une forte densité de population, à des conditions de vie et de travail surpeuplées, ainsi qu'à des changements de mode de vie [265]. Historiquement la tuberculose liée à la pauvreté [248]. Les

personnes à faible SSE sont exposées à plusieurs facteurs de risque évoqués ci-dessus (y compris la malnutrition, l'alcool, tabac etc.) qui augmentent leur risque de tuberculose [266].

- Promiscuité

C'est un facteur très important. La promiscuité accroît le risque de tuberculose infection en augmentant la probabilité du contact avec un sujet tuberculeux [248]. Les personnes vivant ou travaillant dans des environnements où la prévalence de la tuberculose est particulièrement élevée courent un risque élevé d'infection, par exemple le personnel et les détenus des prisons [267], le personnel de santé, les personnes sans domicile [268].

- Pollution de l'air

La fumée du bois ou des biomasses a déjà reconnu comme un facteur de risque de la tuberculose [269-271]. Elle entraîne une altération de la fonction phagocytaire [272]. De plus la combustion des biomasses libère des grandes particules, telles que le monoxyde de carbone, l'oxyde de l'azote, le formaldéhyde et les hydrocarbures poly-aromatiques qui peuvent se déposer profondément dans les alvéoles et causer des lésions [273-275].

2.2.2.2 Pour le bovin

Elles dépendent du pouvoir pathogène du bacille tuberculeux d'une part et de la réceptivité et sensibilité de l'hôte d'autre part.

2.2.2.2.1 Facteurs tenant aux bacilles tuberculeux

- Quantité de l'inoculum

Une dose minimale, variable selon l'espèce inoculée et de la voie de pénétration du bacille.

- Voie d'inoculation

La dose infectante par la voie respiratoire est très faible, inoculation intratrachéale de 6 à 10 bacilles viables à des veaux suffit à provoquer des lésions pulmonaires et/ ganglionnaires [276] ; [277] et pour la contamination par ingestion,

la dose infectante est bien supérieure à celle par la voie respiratoire (plusieurs millions de bacilles) [278] ;[279].

- Répétition des doses

L'inoculation d'une dose unique de bacilles tuberculeux peut n'entraîner que des lésions bénignes évoluant vers la stabilisation, des doses plus faibles mais répétées dans le temps, loin de susciter le développement d'une immunité, favorisant l'apparition d'une tuberculose évolutive [16].

- Virulence de la bactérie

Les bacilles peu pathogènes déterminent une tuberculose localisée limitée au complexe primaire, alors que les bacilles très virulents induisent des lésions exsudatives [16].

2.2.2.2.2 Facteurs tenant à l'hôte

2.2.2.2.2.1 À l'échelle individuelle

La sensibilité des bovins est multifactorielle :

- Age

De nombreuses études dans divers pays ont identifié l'âge comme un facteur de risque [280-282]. La maladie se manifeste plus fréquemment chez les animaux âgés parce qu'elle est de nature chronique et que l'éventualité d'une exposition à l'infection augmente avec le temps [234].

- Sexe

Les facteurs de risque relatifs au sexe sont liés probablement aux pratiques de gestion ou aux habitudes zootechniques [283]. La plupart des études rapportent que la prévalence de la tuberculose bovine est plus élevée chez les femelles que les mâles [284-286]. Cela pourrait probablement être attribué à la longueur de la vie productive des vaches par rapport aux mâles, de plus la nature stressante de l'élevage liée à la gestation, la parturition et la lactation, les rend plus vulnérables aux infections [287].

- Race

La race a été identifiée comme un facteur de risque surtout dans les études africaines, où les races européennes importées peuvent être moins résistantes que les races croisées, cela pourrait s'expliquer par la variabilité des conditions de l'élevage [288], c'est l'utilisation d'une race dans un type de production précis qui est à prendre en compte [163]. La maladie est plus fréquente chez les bovins laitiers que les bovins de boucherie, non seulement que leur vie économique est longue mais aussi parce que les contacts sont étroits entre les animaux, soit au moment de la traite ou par cohabitation dans les étables [234].

- Statut immunitaire

L'immunosuppression est un facteur prédisposant à un certain nombre de maladies y compris l'infection par *M. bovis* [212]. Tous les facteurs entraînant une diminution de l'état général tels que les carences alimentaires, le stress occasionné par des conditions d'élevages intensives et les maladies intercurrentes (fasciolose, diarrhée virale bovine etc.) augmentant la sensibilité au bacille tuberculeux [16].

- Résistance et susceptibilité génétique

Les caractéristiques génétiques de l'hôte pourraient également jouer un rôle important dans la résistance et la sensibilité à l'infection [289-291]. Des études récentes sur des génomes complets de bovins ont identifié des loci particuliers impliqués dans la résistance à la maladie [292].

2.2.2.2.2.2 À l'échelle du troupeau

Les facteurs classiquement incriminés sont les suivant :

- Introduction d'un animal infecté

L'introduction d'un animal infecté représente un important facteur de risque d'apparition de la tuberculose dans un cheptel bovin indemne. Cette introduction peut être due à l'achat d'un animal infecté en provenance d'un marché de bétail ou d'une autre ferme d'élevage infecté ou bien au prêt d'un animal tuberculeux [66]. Plusieurs études suggèrent que la part de risque attribuable à la transmission entre élevages géographiquement proches est plus importante que celle associée à la transmission par le commerce [293] ;[294].

- Voisinage

Le voisinage proche (<3 mètres) de pâtures avec des troupeaux ayant été récemment infectés a été identifié comme un facteur de risque [295]. La proximité des élevages facilite les contacts entre bovins, qu'ils soient directs (mélanges, divagation et prêts d'animaux), ou indirects (prêts de matériel, partage de points d'eau, épandage sur les pâtures du fumier d'un autre élevage). Le voisinage des bovins avec la faune sauvage est considéré comme un élément important pour la contamination et la recontamination des élevages par un contact direct qui soit probablement rare, ou indirect par la fréquentation des points d'eau, des pâtures ou des zones de stockage des aliments contaminés par les déjections de ces animaux infectés [296].

- Persistance

La résurgence d'une infection ancienne, c'est-à-dire la réapparition de la tuberculose dans un élevage atteint puis assaini sans nouvelle introduction de *M. bovis* [297]. Peut être liée à plusieurs mécanismes. Tout d'abord, quand le troupeau ne subit pas un abattage total, l'infection peut persister dans le troupeau chez un bovin infecté faiblement réagissant (ou non réagissant) aux tests de dépistage. La récurrence peut également être liée à la persistance à bas bruit du bacille dans l'environnement, notamment quand la désinfection est insuffisante [66].

CHAPITRE 3

ETUDE CLINIQUE ET DIAGNOSTIQUE DE LA TUBERCULOSE

3.1 Pathogénie

À partir du site d'entrée initial (souvent les poumons), le bacille tuberculeux envahit les ganglions régionaux provoquant souvent des granulomes, en réponse à des facteurs de virulence et à une stimulation antigénique chronique afin de limiter la propagation des bacilles au sein de l'hôte en bloquant l'infection. L'association de chancre d'inoculation et l'adénopathie constitue le complexe primaire ou complexe de « Ghon » [298].

Chez l'homme, La primo-infection est toujours asymptomatique. Dans 90 % des cas, la réponse immunitaire de l'organisme prévient la prolifération des mycobactéries, mais celles-ci peuvent persister à l'état quiescent dans les macrophages. On parle d'infection tuberculeuse latente (l'individu infecté n'est ni malade, ni contagieux). Dans 5 à 10% des cas, les mycobactéries peuvent disséminer dans l'organisme menant à une tuberculose maladie (active) qui peut survenir lors d'un deuxième contact avec le BK (réinfection) ou pour toute baisse de l'immunité cellulaire. Sa localisation est pulmonaire pour les trois quarts des cas et extra-pulmonaire pour le quart restant [299].

Chez le bovin, la primo-infection peut être rester latente ou se développer à une tuberculose secondaire, suivant l'interaction entre le bacille et l'hôte [300]. Si la réponse immunitaire est inefficace, l'infection peut se généraliser à ce stade initial, ce processus est connu sous le nom de généralisation précoce. De même, la généralisation peut se produire dans la phase post-primaire ou après la réinfection et on parle de généralisation tardive. La forme la plus courante de généralisation est la tuberculose miliaire, qui se caractérise par un grand nombre de petits foyers caséux gris à blanc jaunâtre ressemblant à des graines de millet. Ces lésions

peuvent également varier en taille, ce qui suggère une bactériémie plus prolongée. Une généralisation aux surfaces séreuses, en particulier la plèvre, le péricarde ou le péritoine, peut également se produire et se caractérise par de multiples petits tubercules d'environ 0,5 à 1 cm de diamètre qui ressemblent à des perles (Cf. figure 3.1). Les épanchements sur les surfaces séreuses sont très rares dans la tuberculose bovine [301].

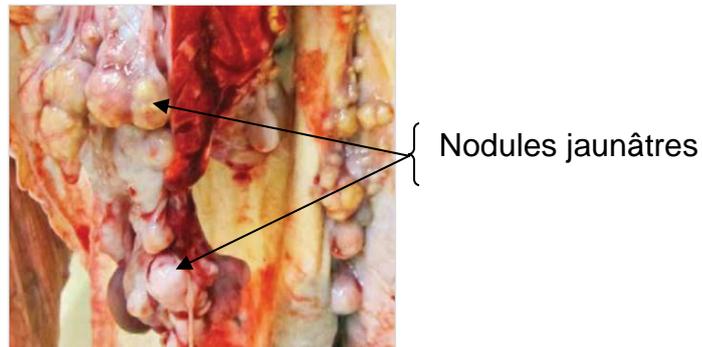


Figure 3.1 : Nombreux nodules jaunâtres ressemblent à des perles sur le tissu pulmonaire (forme perlière) [56].

Certaines formes de généralisation semblent particulièrement fulminantes et étendues et provoquent une caséification diffuse de lésions avec une minéralisation minimale. Ces formes se produisent fréquemment dans le poumon et sont généralement appelées « formes ouvertes » (Cf. figure 3.2).

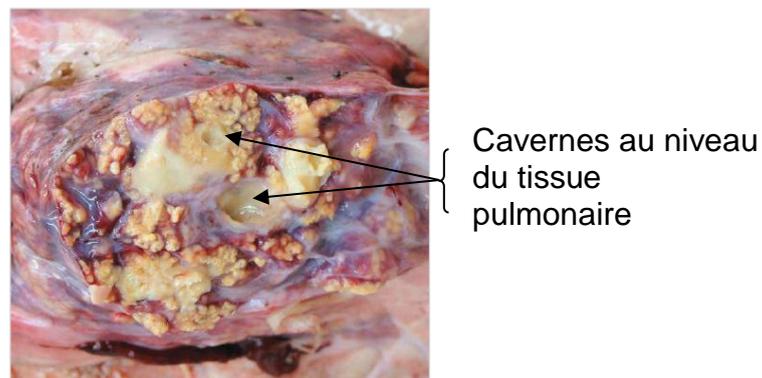


Figure 3.2 : Altération granulomateuse des poumons avec formation des cavités (forme ouverte de la tuberculose) [56].

3.2 Réaction immunitaire antituberculeuse

Après l'inhalation, les bacilles sont dirigés jusqu'au alvéoles où ils sont phagocytés par les macrophages alvéolaires. Les macrophages infectés secrètent

des médiateurs solubles (chémokines et cytokines) stimulant le recrutement d'autres populations cellulaires telles que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les monocytes sanguins et les cellules tueuses (NKs). Les cellules dendritiques phagocytent les mycobactéries, migrent dans les ganglions satellites, y présentent les peptides mycobactériens aux lymphocytes T naïfs (CD4 et CD8), ce qui entraîne leur activation en lymphocytes T effectrices. Ces derniers migrent à leur tour vers le foyer infectieux pour orchestrer la réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD4 Th1 sont des cellules principales de la réponse antituberculeuse, elles sécrètent IFN- γ , l'interleukine 2 (IL2) et le facteur de nécrose des tumeurs alpha (TNF α), qui ont principalement une action synergique sur l'activation des mécanismes microbicides des macrophages tandis que les lymphocytes T CD8 sont plutôt impliqués dans la lyse des macrophages infectés. Le changement de profil de sécrétion de cytokines TH1 vers un profil de sécrétion de type TH2 (interleukine-4 (IL4), IL-5, IL-10) serait associé à la maladie tuberculeuse à un stade tardif [302].

L'ensemble de ces cellules participe à la formation complète du granulome ou « tubercule », qui est un nodule inflammatoire granulomateux jaunâtre circonscrit d'environ 2 à 20 mm de diamètre qui est plus ou moins encapsulé par le tissu conjonctif et contient souvent une nécrose caséuse centrale et une minéralisation [210]. Chez le bovin, tous les organes peuvent être touchés par la tuberculose, mais les lésions tuberculeuses sont localisées 60% des cas dans les poumons et les ganglions lymphatiques (plus souvent nœuds lymphatiques de la tête et de la cavité thoracique). D'autres organes peuvent être touchés, comme l'intestin, le foie, et les reins [56].

Histologiquement, le granulome tuberculeux est formé par un noyau central de matière caséuse, souvent minéralisée, entouré d'infiltrats de macrophages épithélioïdes, de cellules géantes multinucléées de type Langhans et de lymphocytes, le tout souvent entouré d'une capsule fibreuse épaissie et discrète. Chez l'homme, les lésions caséo-nécrotiques peuvent se liquéfier formant ainsi des cavités dans les poumons. La liquéfaction est rare chez les bovins. Contrairement aux lésions caséuses, les lésions liquéfiées peuvent contenir un grand nombre de bacilles acido-résistants (multi-bacillaires) [298].

3.3 Manifestations cliniques

3.3.1 Chez l'homme

La tuberculose se manifeste sous forme pulmonaire et extra-pulmonaire.

3.3.1.1 Tuberculose pulmonaire

La tuberculose pulmonaire représente environ 80% de toutes les formes de tuberculose chez les adultes. Les patients présentent généralement des symptômes de la toux (70 à 90%), de la fièvre (15 à 50%), de la perte de poids (50 à 75%) et de l'hémoptysie d'environ un tiers [244].

3.3.1.2 Tuberculose extra-pulmonaire

La tuberculose extra-pulmonaire représente un groupe de pathologies très diverses, les formes ganglionnaires et pleurales étant les plus fréquentes, suivies par les formes ostéoarticulaires et uro-génitales [303].

- Tuberculose ganglionnaire

Les localisations ganglionnaires représentent entre 30 et 60 % de l'ensemble des tuberculose extra-pulmonaire. Les Ganglions cervicaux sont les plus fréquemment atteints, suivis par les ganglions médiastinaux, axillaires, inguinaux, épitrochléens et mésentériques. La tuberculose ganglionnaire chez les patients séropositifs pour le VIH est caractérisée par des formes plus disséminées avec atteintes ganglionnaires profondes, abdominales en particulier [303].

- Pleurésie tuberculeuse

Les pleurésies tuberculeuses constituent 20% de l'ensemble des cas extra-pulmonaires [304]. La contamination de la plèvre est secondaire à la rupture dans la cavité pleurale d'un foyer caséux pulmonaire ou d'une adénopathie, ou encore à une dissémination hématogène. Cliniquement, le début est habituellement aigu, avec fièvre, toux et douleurs latéro-thoraciques [303].

- Tuberculose ostéoarticulaire

Elle représente environ 5 à 10% de l'ensemble des cas de tuberculose, et l'incidence augmente avec l'âge [244]. Le site le plus fréquemment touché est la

colonne vertébrale et cette forme de tuberculose est connue sous le nom de maladie de « Pott ». Tout autre os ou articulation peut être touché par la tuberculose, mais ceux qui portent plus du poids comme la hanche, le genou, l'articulation sacro-iliaque, l'épaule, le coude et la cheville sont plus susceptibles d'être affectés [131]; [244].

- Tuberculose uro-génitale

Elle représente 4 à 27 % des formes extra-pulmonaires. La tuberculose urogénitale survient plus fréquemment chez les personnes âgées et il y a une prédominance masculine. La tuberculose urinaire se révèle le plus souvent par des signes non spécifiques tels que dysurie, pollakiurie, infections urinaires récidivantes et altération fébrile de l'état général. Elle reste souvent asymptomatique, les lésions n'étant découvertes qu'à un stade avancé. L'atteinte génitale se manifeste habituellement chez l'homme par une orchite-épididymite chronique et chez la femme par une salpingite chronique ou une endométrite. La tuberculose génitale est souvent découverte à l'occasion du bilan d'une infertilité, laquelle représente sa principale complication [303].

- Tuberculose de système nerveux central

L'atteinte du système nerveux central est peu fréquente mais revêt une importance particulière en raison de sa gravité. La méningite tuberculeuse et le tuberculome intracrânien sont les formes les plus fréquentes [305].

- Tuberculose abdominale

Elle représente environ 10 % des cas extra-pulmonaires, concerne surtout le péritoine et l'intestin. Les atteintes des viscères à savoir : le foie, la rate, le pancréas et les surrénales, s'observent plutôt au cours de tuberculose miliaire. La contamination de l'abdomen peut se faire par la déglutition d'expectorations contenant du bacille tuberculeux, une dissémination hématogène, ou l'ingestion de produits laitiers souillés. La tuberculose abdominale atteint le plus souvent l'adulte (35-45 ans), sans prédominance de sexe. Une atteinte pulmonaire associée dans environ la moitié des cas [303].

- Péricardite tuberculeuse

La péricardite tuberculeuse est avec la tuberculose neuro-méningée, l'une des rares formes de tuberculose menaçante pronostic vital à court terme. Le début est habituellement insidieux, marqué par des signes généraux, asthénie, amaigrissement, sueurs nocturnes, fièvre modérée, et l'apparition d'une douleur rétrosternale avec dyspnée et la survenue d'une tamponnade et à plus long terme, l'évolution vers la péricardite constrictive [306].

- Tuberculose oculaire

Le bacille tuberculeux peut infecter les yeux par invasion directe, inoculation ou dissémination hématogène. Presque toutes les parties de l'œil peuvent être touchées : uvéite, rétinite, neuropathie optique, endophtalmie, sclérite, kératite, la conjonctivite et la dacrycystite sont toutes bien décrites [307].

- Tuberculose cutanée

Elle est rare, représentant moins de 1% de tous les cas de tuberculose. Les formes les plus courantes de tuberculose cutanée sont la scrofulodermie et le lupus vulgaris [244].

- Tuberculose miliaire

Les symptômes constitutionnels de la tuberculose miliaire sont généralement : fièvre (80 à 90%), toux sèche (70%), malaise et perte de poids. L'atteinte extrapulmonaire se traduit par une méningite et une atteinte du foie (30 à 50%) et de la rate (20%). L'adénopathie généralisée est rare, sauf dans le cas d'une infection par le VIH [244]. La mortalité due à la tuberculose miliaire est restée élevée malgré la disponibilité d'une thérapie efficace [131].

3.3.1.3 Tuberculose chez la femme enceinte

Pendant la grossesse, atteinte pulmonaire est la plus fréquente mais d'autres formes peuvent être observées telles que : tuberculose miliaire, lymphadénite, ostéomyélite, néphrite, méningite, mammite et péritonite tuberculeuse [131].

3.3.1.4 Tuberculose chez l'enfant

La caractéristique de la tuberculose infantile est une lymphadénite intrathoracique avec ou sans atteinte parenchymateuse [308]. Le risque de dissémination de l'infection est particulièrement élevé chez l'enfant de moins de cinq ans. Chez les adolescents, l'atteinte pulmonaire est souvent caractérisée par le développement de formes cavitaires et les localisations extra-thoraciques peuvent être observées dans environ un tiers des cas [309].

3.3.1.5 Tuberculose zoonotique

Chez l'homme, *M. bovis* peut provoquer les mêmes manifestations cliniques et les mêmes lésions que *M. tuberculosis*. Les formes prévalentes de la maladie étaient extra-pulmonaires (principalement les adénopathies cervicales) et les enfants en étaient les principales victimes. La prédominance de cette localisation est le résultat de l'ingestion du lait cru ou des produits laitiers contaminés non pasteurisés [310]. Concernant la tuberculose pulmonaire causée par le bacille bovin est moins fréquente, mais son incidence est élevée chez les personnes ayant un contact avec des bovins infectés.

C'est dernières années, les manifestations cliniques qui accompagnent l'infection humaine par le bacille bovin ont changé, c'est la forme pulmonaire qui prédomine, suivie par la tuberculose uro-génitale [310].

3.3.2 Chez le bovin

○ Tuberculose respiratoire

Dans la plupart des cas, la tuberculose a une évolution chronique avec une infection limitée aux poumons. Le processus est lent et peut demeurer cliniquement inapparente pendant longtemps. En fait, certains animaux passent toute leur vie sans aucune symptomatologie décelable, tout en constituant une menace potentielle pour le reste du troupeau. D'autres animaux peuvent développer une bronchopneumonie chronique, accompagné de toux et de baisse de production laitière. Dans les cas avancés, lorsque les poumons sont très affectés, une dyspnée est marquée [310].

- Tuberculose génitale

La tuberculose peut affecte à la fois les organes génitaux mâle et femelle. De nombreux cas de tuberculose utérine et vaginale ont été signalés chez les vaches ainsi des cas d'atteinte de pénis chez les taureaux [311]. L'atteinte de l'utérus peut survenir soit par propagation du péritoine vers l'utérus, soit par invasion sanguine, engendrant une forme miliaire ou caséeuse. Parfois, des infections utérines primaires peuvent résulter via d'instruments ou de mains contaminés lors des interventions gynécologiques ou obstétricales [312]. La maladie peut entraîner une salpingite très caractéristique « Médailleurs » qui sont des nodules de 1 à 5 mm de diamètre dispersés sur toute la paroi du salpinx [313].

3.4 Diagnostic

3.4.1 Diagnostic épidémiologique-clinique

3.4.1.1 Chez l'homme

L'altération de l'état générale d'une personne avec des symptômes, tels que l'asthénie, l'amaigrissement, une fièvre persistante, d'une toux chronique suivie d'une hémoptysie durant plus de trois semaines conduit à la suspicion de la tuberculose. Le diagnostic est aussi proposé à des personnes qui y ont un contact avec une personne présentant les symptômes évocateurs de la maladie, ou avec une personne à risque. Toute suspicion de tuberculose maladie doit être confirmé par des examens plus approfondies [314].

3.4.1.2 Chez le bovin

L'évolution de la pathologie est généralement insidieuse et difficilement détectable chez l'animal vivant, ce n'est qu'à un stade tardif de la maladie que le bovin présentera des symptômes [56]. Ces derniers ne sont pas spécifiquement distinctifs de la maladie, surtout dans les pays en voie de développement, où de nombreuses autres maladies chroniques, comme la trypanosomiase africaine, la pleuropneumonie contagieuse bovine ou le multi-parasitisme chronique sont présentes [315]. De ce fait le diagnostic clinique de la tuberculose bovine est difficile à établir.

3.4.2 Examen nécropsique

La détection de la tuberculose à l'aide d'un examen pathologique implique l'observation visuelle, la palpation et l'incision d'organes et de tissus pour détecter les lésions. Un diagnostic présomptif peut être posé sur la base de lésions granulomateuses macroscopiques. Le diagnostic différentiel comprend les granulomes et abcès parasitaires et mycotiques causés par d'autres agents pathogènes bactériens tels que *Actinomyces bovis*, *Actinobacillosis* et *Trueperella pyogenes*, ainsi que le lymphosarcome bovin [216];[316]. De plus, de très petites lésions peuvent être manquées et ne peuvent être détectées qu'au microscope. Il a été constaté que l'inspection de routine de la viande *post-mortem* ne détecte qu'environ 47% des lésions présumées [40]. Malgré le manque de sensibilité, l'inspection *post-mortem* reste une méthode cruciale pour le contrôle de tuberculose bovine [317].

3.4.3 Diagnostic de laboratoire

3.4.3.1 Méthodes directes

3.4.3.1.1 Examen radiologique

La radiographie thoracique est la principale évaluation radiologique de la tuberculose pulmonaire suspectée ou avérée [318]. Lors de cet examen, trois types de lésions de morphologie et d'étendue variables, caractéristiques d'une tuberculose pulmonaire sont recherchées : les nodules, les infiltrats et les cavernes [319].

La tomodensitométrie thoracique est généralement nécessaire pour détecter les lésions fines qui peuvent être non détectables par la radiographie thoracique. Elle fournit des informations précieuses pour évaluer les complications de la maladie. La radiologie thoracique est utile mais n'est pas spécifique pour diagnostiquer la tuberculose pulmonaire, il doit être suivie d'un examen bactériologique [318].

3.4.3.1.2 Examen histopathologique

Cet examen consiste en analyse microscopique des claques directs à partir des échantillons cliniques ou sur des tissus préparés. Les préparations histologiques sont colorées à l'aide de la coloration hémalun-éosine (HE),

complétée par la coloration de Ziehl-Neelsen. Le diagnostic histologique permet de mettre en évidence les lésions caractéristiques de la tuberculose [320]. Un diagnostic présomptif d'infection tuberculeuse peut être établi si l'échantillon présente une lésion histologique caractéristique du granulome tuberculeux (Cf. figure 3.3) [321]. C'est un examen rapide (5 à 7 jours), dont la sensibilité estimée à 88%, mais manquant de la spécificité (Les résultats histopathologiques sont similaires pour toutes les lésions à CMT) [320].

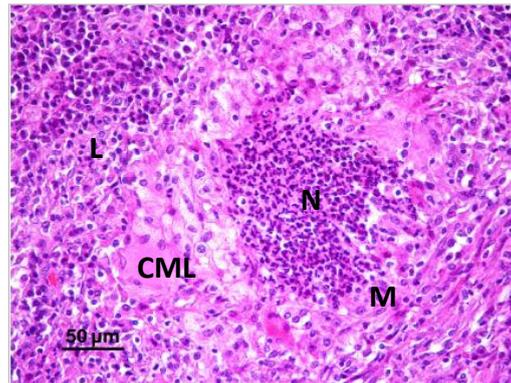


Figure 3.3 : Coupe histologique colorée par HE d'un granulome tuberculeux. (les neutrophiles sont abondants au centre du granulome (**N**) et sont entourés de macrophages (**M**), de cellules multinuclées de type Langhans (**CML**) et de lymphocytes (**L**)) [301].

Examen direct demeure un outil très simple et rapide renseignant sur la présence des bacilles Acido-Alcool-résistants dans les échantillons biologiques [322]. Cet examen est souvent le seul pratiqué dans les pays en développement en raison de sa facilité d'accès, son efficacité et son faible coût [323]. Pour mettre en évidence les bacilles de la tuberculose à l'examen microscopique, on utilise la propriété d'acido-alcool-résistance des mycobactéries [324]. Cette étape clé repose sur une coloration fluorescente à l'auramine (coloration de Dugommier), plus sensible que celle de Ziehl-Neelsen (coloration de référence) avec un gain de 10% [325].

3.4.3.1.3.1 Coloration de Ziehl Neelsen

Elle comporte plusieurs étapes, tout d'abord, les frottis sont colorés par la fuchsine phéniquée à chaud, puis, après une décoloration combinée par l'acide et l'alcool, une contre coloration par le bleu de méthylène. À l'examen microscopique

avec un objectif à immersion (X 100), les BAAR apparaissent comme des bâtonnets rouges sur un fond bleu (Cf. figure 3.4) [248]. La sensibilité de cette méthode est de 70%, mais sa spécificité est très faible [326].

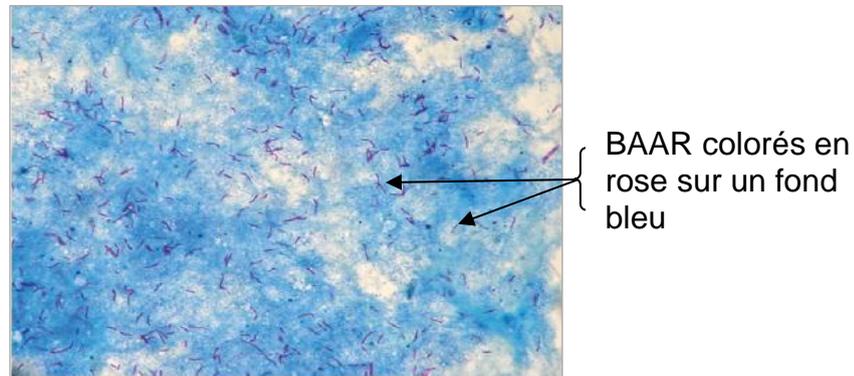


Figure 3.4 : Frottis d'un crachat coloré par Ziehl-Neelsen [327].

3.4.3.1.3.2 Coloration fluorescente à l'auramine

Dans cette méthode la fuchsine est remplacée par l'auramine [248], ce dernier se fixe sur le bacille et lui confère une fluorescence qui persiste après l'action de l'acide et l'alcool [328]. La lecture après cette coloration requiert un microscope à fluorescence utilisant des lampes à mercure supplémentée récemment par l'utilisation de light emitting diode (LED), moins coûteuse, plus robuste et de performance identique [329]. Selon les données de l'OMS, la microscopie LED (M-LED) a montré une sensibilité et une spécificité de 84% et 97% respectivement. La lecture s'effectuant à l'objectif (X25) est beaucoup plus rapide que celle de Ziehl Neelsen [330]. Les BAAR apparaissent sous forme de bacilles verts fluorescents sur un fond sombre (Cf. figure 3.5) [248].



Figure 3.5 : Coloration fluorescente à l'auramine du frottis d'un crachat [331].

Une positivité à l'auramine doit être confirmée par une coloration de Ziehl qui permettra en plus de dénombrer les bacilles par champ [332].

Cet examen, peu coûteux, permet un dépistage rapide en quelques heures, cependant il présente deux inconvénients : le manque de sensibilité et de spécificité. Il faut en effet plus de 10^4 bacilles /ml de produit pathologique pour que l'examen soit positif, et les différentes études montrent que la sensibilité est d'environ 50 % pour les échantillons d'origine pulmonaire et qu'elle est encore plus faible pour les extra-pulmonaires. Le manque de spécificité est lié au fait que l'examen microscopique ne permet pas de différencier les bacilles de la tuberculose et les mycobactéries atypiques [332].

3.4.3.1.4 Culture bactérienne

La culture est le gold standard pour le diagnostic de la tuberculose [333]. Elle permet d'isoler la souche, support technique nécessaire à l'identification d'espèce et aux tests de sensibilité aux antituberculeux. Elle reste la méthode la plus sensible, dont le seuil de détection est de 10 à 10^2 bacilles/ml d'échantillon biologique [334].

En raison des exigences nutritives et la croissance lente des bacilles tuberculeux, il est nécessaire d'employer des milieux de culture enrichis et avant les ensemencer, de débarrasser les prélèvements des micro-organismes commensaux dont la croissance est rapide.

La décontamination des prélèvements repose sur la propriété que les mycobactéries résistent mieux à certains antiseptiques que les autres bactéries. Les produits utilisés sont la soude ou un acide dilué [248]. En effet, il existe plusieurs méthodes d'homogénéisation et de décontamination :

- Méthode de Petroff : Cette méthode implique l'utilisation de NaOH à des concentrations comprises entre 2% et 4% [335]. Elle est efficace contre les germes de souillure mais est également corrosive pour les mycobactéries car pouvant tuer environ 70% des bacilles [336]. D'autres variante (méthode de Petroff modifiée) de la méthode existent avec toujours utilisation de la soude en première intention et neutralisation par d'autres méthodes adaptées hormis la neutralisation par la solution de tampon telle que décrite par Petroff [337].

- Méthode de Kent et Kubica : Les échantillons non conservés peuvent être décontaminés et homogénéisés à l'aide de la méthode N-acétyl-cystéine 2% NaOH [338]. Cette méthode est la plus recommandée des méthodes de décontaminations car le culot obtenu peut être utilisé pour tous les types de milieux de culture et les différentes analyses [339].
- Méthode hypertonique saline – hydroxyde de sodium (HS – SH) : Les sédiments résultants peuvent être utilisés dans les différentes analyses biomoléculaires et peuvent être conservés pour une utilisation ultérieure pour la sensibilité aux médicaments [337]. Pour cette raison, cette méthode est un candidat potentiel pour l'évaluation et l'adoption par programmes nationaux de lutte contre la tuberculose dans les pays en développement [340].
- Méthode de Tacquet et Tison au laurylsulfate alcalin : les échantillons sont décontaminés au lauryl-sulfate de sodium puis neutralisés par une solution d'acide phosphorique contenant du bleu de bromothymol. Cette méthode de décontamination est un bactériostatique pour les mycobactéries et un inhibiteur de l'amplification génique [337].
- Méthode de Péres, Gevaudan, Gulian et de Micco à la chlorhexidine : La chlorhexidine réagit avec les radicaux chargés négativement de la paroi bactérienne mais n'a pas d'action sur les mycobactéries, notamment sur *M. tuberculosis* d'où son utilisation comme méthode de décontamination pour la mise en culture des mycobactéries [337].
- Méthode à l'acide oxalique : Elle implique utilisation de l'acide oxalique à 4 ou 5 %, elle est recommandée pour le traitement des expectorations très contaminées ou pyogènes et peut être utilisée pour la recherche des bacilles du Complexe *Mycobacterium avium* dans les selles [339]. Elle est également utilisée pour la recherche des mycobactéries non tuberculeuses chez des patients atteints de fibrose kystique [341].
- Méthode de Lowenstein à l'acide sulfurique (4%) : elle est généralement utilisée pour des échantillons médicaux et vétérinaires très contaminés [342]

ainsi que sur l'eau de l'environnement pour la recherche des mycobactéries. Elle est recommandée beaucoup plus pour la recherche des mycobactéries non tuberculeuses [343].

- Méthode au cétylpyridium 1 % + NaCl 2 %: Cette méthode est utilisée prioritairement pour préparer les expectorations qui seront transportées vers des laboratoires pratiquant la culture. La culture est faite après uniquement sur milieux solides Loewenstein Jensen [344]. Cette méthode peut être utilisée pour décontaminer les eaux en vue de la recherche des mycobactéries [337].
- Méthode de Kudoh: elle est recommandée pour les expectorations très contaminées et si la culture est différée de 2 à 4 jours. C'est une méthode qui ne demande pas de gros équipements et la décontamination ne prend que deux minutes. Elle est d'application plus facile dans les laboratoires du milieu rural ne disposant pas d'équipements suffisants pour l'utilisation des méthodes de Petroff ou de Kubica [345]. Le taux de cultures contaminées est moins qu'avec la décontamination par la méthode de Petroff (3,7 % voir 7,3 %) [346].

NB : le mode opératoire de chaque méthode de décontamination est illustré en Appendice B [337].

Le protocole de la décontamination doit être soigneusement respecté pour réduire les risques de contamination de la culture sans tuer trop les mycobactéries. Malgré toutes les précautions, 2 à 5% des cultures soient souillées par insuffisance de décontamination et 50 à 90% des mycobactéries viables sont cependant tuées [248].

3.4.3.1.4.1 Milieux de culture

Les échantillons décontaminés peuvent être inoculés dans les milieux solides ou milieux liquides. L'OMS préconise l'inoculation parallèle sur les deux milieux afin de combiner la spécificité plus élevée des milieux solides avec la sensibilité plus élevée des milieux liquides [347].

3.4.3.1.4.1.1 Milieux solides

Milieux solides à l'œuf coagulés

- Milieu de Lowenstein-Jensen (L-J)

C'est un milieu solide synthétique composé de sels minéraux, d'œufs, d'asparagine, de glycérine, fécula, citrate, et le vert de malachite. Ce dernier inhibe la croissance des autres micro-organismes et fournit une couleur contrastante, qui permet la détection des petites colonies [112].

Sur le milieu de Lowenstein-Jensen, les colonies de *M. bovis* sont petites (1 à 2 mm), dysgoniques non pigmentées et la surface lisse d'abord plates elles deviennent ensuite bombées et brillantes en « gouttelettes » sans dépasser la taille d'une tête d'épingle (Cf. figure 3.6) [108], tandis que les colonies *M. tuberculosis* sont lisses et crèmes sur les cultures jeunes, puis atteignent plus de 5 mm de diamètre et deviennent beiges, rugueuses, à bords irréguliers en chou-fleur dites « eugoniques » (Cf. figure 3.7) [348].



Figure 3.6 : Aspect des colonies du *M. bovis* sur L-J [54].



Figure 3.7 : Aspect des colonies du *M. tuberculosis* sur L-J [54].

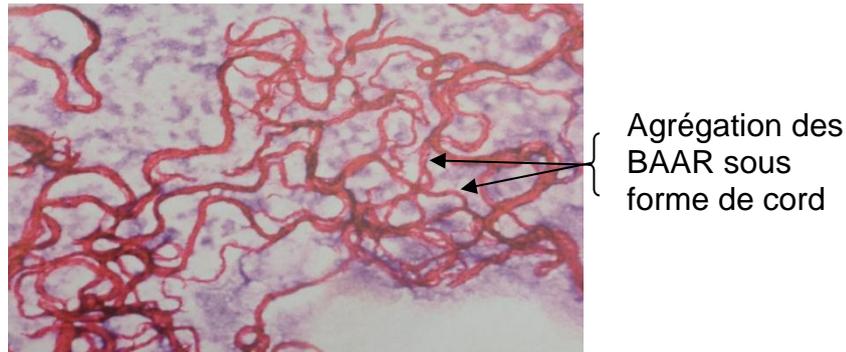
- Milieu de Coletsos

Le milieu Coletsos permet une culture rapide et abondante avec des colonies plus volumineuses que sur L-J [349]. Ce milieu a complété L-J avec du pyruvate de sodium, de la gélatine, du glutamate de sodium, du charbon actif et des oligonucléotides et des concentrations faibles en glycérol [350]. Cet enrichissement a optimisé l'isolement des mycobactéries particulièrement exigeantes (*M. bovis* et *M. africanum*) [351].

Milieus solides gélosés (Middlebrook 7H10 7H11)

Des milieux semi-synthétiques transparents contiennent des sels minéraux, du pyruvate de sodium, de l'hydrolysate de caséine (7H11) et nécessitent l'addition extemporanée d'un supplément contenant acide oléique, dextrose albumine et catalase lors de leur préparation, et une incubation sous 5 % de CO₂. Les colonies de *M. tuberculosis* sont plates, sèches et rugueuses. La croissance de *M. tuberculosis* est un peu plus précoce (milieu transparent), mais l'observation des colonies est plus difficile que sur les milieux à l'œuf et nécessite parfois une observation à la loupe binoculaire [348].

Dès l'apparition des colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen sera effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive [348]. Si la coloration démontre le phénomène de cordage (Cf. figure 3.8), il y a une forte probabilité de l'infection tuberculeuse. Bien que, le cordage est hautement prédictif de *M. tuberculosis*, mais il n'est pas pathognomonique, car rarement des mycobactéries non tuberculeuses démontrent ce phénomène [352].



Agrégation des
BAAR sous
forme de cord

Figure 3.8 : Agrégation des BAAR sous forme des cordes (Cord Factor positif) dans un frottis réalisé à partir d'une culture positive et coloré par ZN (grossissement X100) [353].

3.4.3.1.4.1.2 Milieux liquides

Les milieux liquides sont fabriqués pour la plupart avec la même base (7H9) et doivent être supplémentés avec des facteurs de croissance rendus sélectifs à l'aide d'un mélange d'antibiotiques (afin d'augmenter la spécificité de la culture). Plusieurs techniques de culture en milieu liquide ont été développées [348].

- Respirométrie radiométrique (système BACTEC)

Il repose sur la détection du $^{14}\text{CO}_2$ produit dans milieu liquide 7H12B [351], contenant de l'acide palmitique marqué au ^{14}C comme seule source de carbone [332]. L'appareil BACTEC 460TB[®] mesure la quantité de CO_2 radioactif dans l'atmosphère du flacon [328].

- Milieu *Mycobacteria growth indicator tube* (MGIT 960)

Il contient un milieu à base de 7H9 avec enrichissement, antibiotiques et un indicateur fluorescent en bas de chaque tube [352]. La détection de croissance est indiquée grâce à l'indicateur fluorescent qui est sensible à la concentration du milieu en oxygène. La diminution de la concentration d' O_2 génère une fluorescence. Cette dernière est détectable à l'œil nu (Cf. figure 3.9) ou à l'aide d'un automate (MGIT 960[®]) [348].

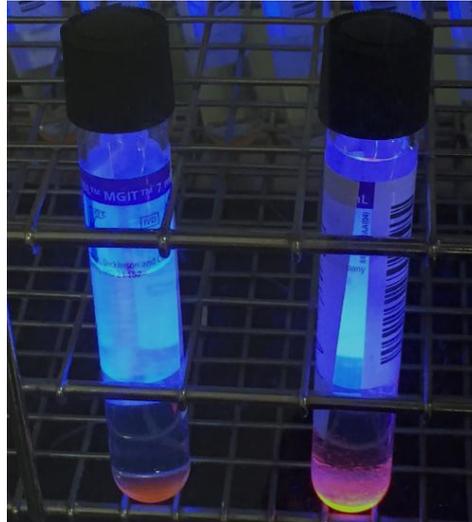


Figure 3.9 : Milieu MGIT 960. A droite une culture positive (+ fluorescence) et à gauche une culture négative [352].

- Bouillon Dubos

Ce milieu contient des sels inorganiques, une digestion enzymatique de caséine et de l'acide L-asparagine comme source de nutriment, du polysorbate 80 et de l'ester d'acide oléique comme source d'acides gras essentiels et d'albumine bovine comme agent protecteur de la liaison d'acides gras libres toxiques pour les mycobactéries [355].

La croissance des mycobactéries dans les milieux liquides est nettement plus rapide que sur les milieux solides, ce qui réduit le délai associé à la culture mycobactérienne. De plus, les taux d'isolement utilisant des milieux liquides sont généralement plus élevés qu'avec des milieux solides [356].

Dans certaines circonstances, des antibiotiques peuvent être ajoutés au milieu solide afin d'empêcher la contamination par les bactéries qui ont survécu à la procédure de décontamination. Parmi ces milieux : Lowenstein-Jensen Gruft, qui contient de la pénicilline, de l'acide nalidixique et du vert de malachite, et le milieu sélectif 7H11 (S7H11) de Middlebrook, qui contient de la carbénicilline, de la polymyxine B, du lactate de triméthoprime, de l'amphotéricine B et du vert de malachite [352].

3.4.3.1.5 Identification phénotypique des mycobactéries

L'identification des mycobactéries obtenues en culture pure sur milieu solide repose classiquement sur l'étude des caractères cultureux (le temps de croissance, morphologie et pigmentation des colonies) et biochimiques (la résistance aux acides, la production de niacine, la réduction des nitrates et l'inactivation de la catalase) (Cf. tableau 3.1) [248]; [357].

Tableau 3.1 : Identification d'espèces à partir des caractéristiques phénotypiques [110].

Espèce	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. atypique</i> [348]
Délais de culture	14-28 jours	> 28 jours	4-30jours/plus
Aspect macroscopique	Eugoniques rugueux	Dysgoniques lisse	Rugueux/Lisses
Couleur	Beige	Cire de bougie	-
Pigmentation	Non pigmenté	Non pigmenté	Pigmenté/non
Niacine	+	-	-
Nitrate réductase	+	-	+ /-
Catalase à 22 C°	+	+	+
Catalase à 68 C°	-	-	+
TCH [354]	R	S	R
PNB [358]	S	S	R

TCH : Hydrazide de l'acide Thiophène 2 Carboxylique ; **PNB** : Acide Para Nitro-Benzoïque ; **S** : Sensible ; **R** : Résistant.

Dans ces dernières années, le typage phénotypique des mycobactéries est basé sur l'analyse de la composition de la paroi mycobactérienne par :

3.4.3.1.6 Identification antigénique par immuno-chromatographie

Il existe deux types de tests immuno-chromatographiques pour la recherche du CMT :

- Le premier test repose sur la détection de l'antigène MPT64, protéine incriminée dans la virulence et sécrétée par les mycobactéries du CMT. Cette détection sur kit unitaire est réalisée en 15 minutes à partir de culture en milieu solide ou liquide. La sensibilité et la spécificité sont de l'ordre de 99 %.

Ce test permet d'identifier le complexe tuberculosis, hors BCG, dès la positivité de la culture [359].

- Le deuxième test est réalisé directement sur les urines du patient suspect de tuberculose afin de détecter de lipo-arabinomannane. Ce test est peu coûteux, rapide et facile, utilisé généralement dans les pays en voie de développement à forte incidence de co-infection tuberculose-VIH [360].

3.4.3.1.7 Identification par chromatographie et spectrométrie de masse MALDI-TOF

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été l'une des premières méthodes non biochimiques utilisées pour identifier les isolats cliniques de mycobactéries, y compris les membres CMT [361]. Cette méthode évalue le profil d'acide mycolique des bacilles tuberculeux. Les profils générés sont analysés par une base des données qui contient des mycobactéries bien caractérisés [362]. Elle permet l'analyse d'un grand nombre de souches (96 souches), mais elle nécessite une culture pure, généralement cultivée sur des milieux solides [363]; [362].

L'analyse des profils protéiques par spectrométrie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF MS) en association avec un logiciel de bioinformatique spécifique permet une identification rapide (moins de deux heures) de mycobactéries du CMT et mycobactéries non tuberculeuses [364]; [365]. La fiabilité de l'identification à partir d'un milieu solide semble supérieure (97%) à celle effectuée à partir d'un milieu liquide (77%). Certains composants du milieu liquide interfèreraient sur la qualité des spectres et parfois l'inoculum bactérien serait trop faible [366]. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a récemment été couplée dans la technologie iPLEX Gold (Sequenom) à une analyse de polymorphismes génétiques permettant à la fois de différencier les espèces du complexe tuberculosis mais aussi de renseigner sur la phylogénie à des fins épidémiologiques [367].

3.4.3.1.8 Diagnostic moléculaire de la tuberculose

3.4.3.1.8.1 Détection des mycobactéries dans les échantillons cliniques

Plusieurs techniques moléculaires ont été développées pour la détection directe des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques. Celles-ci sont basées sur l'amplification de fragments cibles d'ADN ou d'ARN mycobactériens uniques par PCR. L'élément d'insertion IS6110 et l'ADNr 16S sont les cibles les plus couramment utilisées. D'autres régions utilisées pour l'amplification comprennent le gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, le gène codant pour la protéine 32 kD, le gène *recA*, le gène *hsp65*, le gène *dnaJ*, le gène *sodA* et l'ADNr 16S-23S interne espaceur de transcripteur [368]. Les principaux kits commercialisés sont :

- Test classique de PCR (Amplicor *M. tuberculosis* test)

Ce test est basé sur l'amplification des séquences d'ARN ribosomal libérées de la (Amplicon) cellule cible. Leur détection est réalisée par hybridation d'acide nucléique. Une sonde d'ADN marquée par un ester d'acridinium se combine avec l'amplicon pour former un hybride stable et les hybrides marqués sont mesurés dans un luminomètre [368].

- Test de PCR temps réel (Amplicor Cobas Amplicor *M. tuberculosis* assay)

Ce test est basé sur l'amplification par PCR d'un segment de 584 pb du gène de l'ADNr 16S suivie de l'hybridation des produits amplifiés marqués à la biotine à une sonde oligo-nucléotidique spécifique du complexe *M. tuberculosis*, enrobée sur des plaques de microtitrage [368].

- Test d'amplification génique par la méthode LCxg

Ce test fait intervenir quatre sondes oligo-nucléotidiques qui reconnaissent une séquence cible d'ADN qui code pour l'antigène b, qui est spécifiques aux membres CMT [369]. Dans un premier temps, une ADN polymérase thermostable comble les espaces entre les amorces, ensuite une ligase thermostable réunit les fragments les uns aux autres. L'ensemble du processus prend environ 6 heures [370].

- Technique NASBA (Nucleic Acid Sequenc-Based Amplification)

C'est une technique isotherme d'amplification d'ARN. Elle comporte trois étapes, la première étape consiste à l'extraction de l'ARNr 23S, suivie par l'amplification de l'ARN par la méthode NASBA puis l'hybridation inverse des produits amplifiés sur des bandes membranaires à l'aide d'un système automatisé. Le test a la capacité de détecter simultanément *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense* et CMT [368].

3.4.3.1.8.2 Identification moléculaire des espèces mycobactériennes à partir des cultures

- Séquençage basé sur la PCR

C'est une méthode de référence pour l'identification des mycobactéries. Dans un premier temps, une amplification par PCR, suivie d'un séquençage des amplicons dans un séquenceur automatique. L'identification d'une souche inconnue est complétée par comparaison de la séquence nucléotidique avec une banque de séquences connues [368]. Plusieurs gènes cibles ont été utilisés pour la procédure, mais le plus commun est le gène de l'ARNr 16S. D'autres gènes cibles importants sont ceux codant pour la protéine de choc thermique de 65 kDa, la protéine de 32 kDa, l'espaceur transcrit interne de l'ARNr 16S-23S (ITS) et le gène *ecA* [371].

- GenoType *Mycobacterium*

La procédure comprend une PCR multiplex, suivie d'une hybridation inverse et d'une technologie de sonde en ligne. Il existe trois kits : le GenoType CMT est basé sur le polymorphisme du gène *gyrB* pour distinguer les espèces du complexe *M. tuberculosis*, le GenoType *Mycobacterium* CM (Common Mycobacteria) et GenoType *Mycobacterium* AS (Additional Species) pour NTM [372]. Ces derniers tests utilisent l'ADNr 23S comme cible [373].

- Polymorphisme de restriction du gène *hsp65*

C'est une méthode basée sur l'amplification du gène codant pour la protéine de choc thermique de 65 kDa, suivie d'un polymorphisme de longueur de fragment de restriction, en utilisant deux enzymes de restriction BstEII et HaeIII. Des isolats de cultures solides et liquides peuvent être utilisés. Les fragments de la digestion

par l'enzyme de restriction sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et comparés. La détermination de la taille des fragments permet d'identifier une cinquantaine d'espèces de mycobactéries [348].

- Technique des sondes ADN

Elle permet l'identification d'une série de mycobactéries cliniquement importantes. Ce sont le complexe *M. tuberculosis*, le complexe *M. avium*, *M. avium*, *M. kansasii* et *M. goodii*. Les sondes d'ADN sont des oligonucléotides d'ADN simple brin marqués à l'ester d'acridine qui sont complémentaires de la cible, qui est l'ARNr. La procédure peut être complétée en moins de deux heures [368].

3.4.3.1.9 Typage moléculaire

Les méthodes de typage moléculaire des mycobactéries reposent sur la diversité des structures génétiques de ces micro-organismes [374]. Une série de nouvelles méthodes moléculaires tente d'associer des marqueurs génétiques spécifiques à la virulence des souches, aux mécanismes de résistance, à la pathogénèse et à la dynamique de transmission. Ces informations sont cruciales pour lutte contre la tuberculose [368]. Les principales méthodes utilisées aujourd'hui sont :

3.4.3.1.9.1 RFLP IS6110 (Restriction Fragment Length Polymorphism)

L'analyse d'IS6110 par polymorphisme de longueur des fragments de restriction est devenue la méthode de référence pour le génotypage de *M. tuberculosis* et pour comprendre la dynamique de transmission de la tuberculose [375]. IS6110 est une séquence d'insertion de 1355 pb spécifique aux membres CMT. Le polymorphisme des profils RFLP est basé sur le nombre de copies IS6110 et leurs emplacements sur le génome bactérien [376] ;[375]. Habituellement, il y a 8 à 18 copies par souche, mais le nombre peut varier de 0 à 25. Selon un protocole standardisé, l'ADN génomique est digéré par l'enzyme de restriction PvuII, qui clive IS6110 une seule fois. Les fragments d'ADN résultants sont séparés par électrophorèse, transférés sur une membrane et hybridés avec une sonde marquée complémentaire de l'extrémité 3' de la séquence IS6110. Les modèles de bandes

d'hybridation sont visualisés sur un film radiographique et chaque bande désigne une seule copie d'IS6110.

La méthode IS6110-RFLP a un pouvoir discriminant élevé, est facilement reproductible en laboratoire, et a donc longtemps été considérée comme "gold standard" parmi les méthodes de typage applicables au CMT [377]. Cependant, elle a un faible pouvoir discriminant pour les souches contenant moins de 6 copies IS6110 tels que les souches *M. tuberculosis* d'origine d'Asie et les souches *M. bovis* (1-5 copies). De plus, cette méthode nécessite une grande quantité (environ 2 à 10 µg) d'ADN et demande beaucoup de main-œuvre [378]. Malgré ces limites, la méthode IS6110-RFLP reste l'une des approches les plus couramment utilisées pour le typage de *M. tuberculosis* et ait longtemps été considérée comme la technique de référence dans les enquêtes épidémiologiques moléculaires sur la tuberculose [379].

3.4.3.1.9.2 Spoligotypage (Spoligotyping: Spacer OLIGONucleotide TYPING)

Le spoligotypage fait partie des techniques de PCR les plus utilisées pour l'épidémiologie moléculaire et l'étude phylogéographique du CMT [380]. Cette méthode repose sur le polymorphisme d'une région génomique particulière appelée locus DR « Direct Repeat » [381]. Ce locus comprend des séquences répétées directes (DR) de 36 pb, séparées par 43 espaceurs uniques non répétitifs, dont chacun contient 36 à 41 pb de longueur [382].

Dans la méthode de spoligotypage, l'ensemble du locus DR est amplifié par PCR, en utilisant deux amorces inversées marquées à la biotine et complémentaires de la séquence DR. Les produits de PCR sont hybridés perpendiculairement aux oligonucléotides sur une membrane activée. Après l'hybridation, la membrane est incubée dans un conjugué streptavidine-peroxydase ou streptavidine alcaline qui se lie au marqueur biotine des produits de PCR. La détection de l'hybridation est effectuée par un système de détection par chimiluminescence amélioré (ECL) [368]. Les spoligotypes sont ensuite visualisés sur un film radiographique [12]. Une amélioration et une automatisation supplémentaires de spoligotypage ont conduit à l'application de système de détection à base de microbilles, tels que la technique "Luminex" [383], qui permet l'analyse de 96 isolats en un seul essai, contre 45 isolats avec le protocole de

M. tuberculosis sont : H (Haarlem), LAM (Latin America and Mediterranean), T (Tuscany), EAI (East African-Indian), X (Anglo Saxon), CAS (Central Asian), Beijing, MANU et S [389].

Le spoligotypage peut être effectué directement sur les échantillons cliniques, les cultures non viables, les lames de frottis Ziehl-Neelsen ou les coupes de tissus inclus dans la paraffine [390] ; [391]. La sensibilité du spoligotypage a été estimée à 10 fg (10^{-15} g) d'ADN, correspondant à 2-3 cellules bactériennes [392]. L'une des limites de cette technique étant sa tendance à surestimer le regroupement en grappes du CMT, il a rapidement été proposé de compléter cette technique par un typage reposant sur des minisatellites (MIRU-VNTR) [393].

3.4.3.1.9.3 MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats)

C'est une méthode qui permet de différencier les souches en évaluant le nombre et la longueur des répétitions en tandem à chaque locus de chaque isolat. La variabilité de locus particuliers dépend souvent de la collecte d'échantillons, de la source géographique de l'échantillon et de la variabilité génétique naturelle des souches [394]. La méthode MIRU-VNTR est basée sur l'analyse de segments d'ADN contenant des séquences répétées en tandem [395], observées à chacun des 12, 15 ou 24 loci sélectionnés de 41 loci de type mini-satellite réparties sur le chromosome de CMT [396]. Cette méthode comprend l'amplification par PCR de chaque locus en utilisant des amorces spécifiques complémentaires et l'analyse des produits PCR résultants, qui sont séparés par électrophorèse sur gel. La taille des produits amplifiés correspond au nombre d'unités de répétition en tandem, qui est déterminé en référence à la taille connue de l'unité de répétition dans chaque locus ciblé. Le typage MIRU-VNTR peut être effectué à l'aide d'une électrophorèse capillaire et d'amorces PCR marquées par fluorescence [394]. Les résultats du typage MIRU-VNTR sont exprimés dans un format numérique simple dans lequel chaque chiffre représente le nombre de copies à un locus particulier. Les données numérisées permettent de comparer les résultats entre les laboratoires du monde entier à travers des bases des données internationales (SITVITWEB ; MIRU-VNTRplus) [397] ; [398].

Généralement, le génotypage basé sur les régions MIRU-VNTR est rapide, facile à réaliser, sensible, hautement reproductible et discriminant. Elle peut être réalisée dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques, génétiques ou évolutives à grande échelle [397] ; [398]. Une analyse comparative des méthodes de typage a montré que le pouvoir de discrimination du typage MIRU-VNTR est plus élevé que le spoligotypage, et seulement légèrement inférieur à IS6110-RFLP [13] ; [399]. La combinaison de la technique MIRU-VNTR et spoligotypage optimise la discrimination des souches pour la phylogénie et pour les suivis épidémiologiques [400].

3.4.3.1.9.4 Typage par région de délétion (RD)

Le typage par région de délétion (RD) est utilisé pour la différenciation entre les espèces CMT. RD9 est utilisé pour différencier *M. tuberculosis* des autres membres du CMT et RD4 qui est absente dans tous les isolats de *M. bovis*. D'autres RD supplémentaires ont été découverts, à savoir RD2^{seal}, RD1^{mic}, RD1^{das}, RD1^{mun}, RD12^{oryx} et RD1 BCG, pour distinguer *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. dassie bacillus*, *M. mungi*, *M. orygis* et *M. bovis* BCG, respectivement, d'autres espèces [401].

3.4.3.1.9.5 Polymorphisme nucléotidique unique (SNP)

Les polymorphismes nucléotidiques uniques (SNPs) correspondent à des mutations ponctuelles d'une base dans un génome [11]. Les SNPs se répartissent en deux grands groupes : SNPs non synonymes sont des changements modifiant la séquence polypeptidique et pourraient éventuellement fournir un avantage sélectif aux souches. Ils sont particulièrement utiles pour comprendre l'acquisition et la propagation de la résistance des souches aux antituberculeux [402]. D'autre part, les SNPs synonymes n'altèrent pas les profils d'acides aminés et sont donc phénotypiquement neutres. Ils sont utilisés pour la génétique des populations et pour l'étude des relations phylogénétiques entre les souches mycobactériennes [403] ; [404]. L'approche de typage SNP est très spécifique et sensible et représente les marqueurs les plus fiables pour la classification des lignées du CMT [379].

3.4.3.1.9.6 Séquençage complet du génome (WGS : Whole Genome Sequencing)

Le séquençage complet du génome fournit des informations sur l'ensemble du génome, et peut identifier pratiquement toutes les variétés de marqueurs détectés par les méthodes de génotypage classiques [405]. C'est une méthode

rapide, fiable et de plus en plus abordable peuvent désormais guider toutes les composantes de la lutte antituberculeuse : diagnostic, traitement, surveillance et recherche de la source d'infection [406] ; [407]. Il peut être utile pour explorer des questions importantes sur la biologie des mycobactéries, y compris les mécanismes évolutifs formant les populations de mycobactéries [408] ou la virulence et l'immunogénicité [409]. Il permet aussi l'identification des profils de résistance aux médicaments peuvent être prédits, particulièrement bien pour les médicaments de première intention, permettant une mise en place rapide et appropriée du traitement et le suivi de l'acquisition de la résistance aux médicaments [410]. WGS offre une résolution supérieure à celle des autres méthodes actuelles telles que IS6110-RFLP, spoligotypage ou MIRU-VNTR 24 [411] ; [412].

3.4.3.2 Méthodes indirectes

3.4.3.2.1 Mise en évidence de l'immunité à médiation cellulaire

Les tests d'intradermo-tuberculation et la libération d'interféron gamma visent à mettre en évidence la mémoire immunitaire suite à un contact avec une mycobactérie du complexe *tuberculosis* [413].

3.4.3.2.1.1 Intradermo-tuberculation

➤ Chez l'homme

La technique utilisée pour effectuer IDR chez l'homme est celle de Mantoux. Ce test se pratique en injectant par voie intradermique sur la face interne de l'avant-bras de 0,1 ml de solution correspond à 2 unités de tuberculine PPD RT23 [414]. L'IDR mesure la réponse cutanée *in vivo* due à la réaction inflammatoire, avec hypersensibilité retardée. Dans les heures suivant l'injection, il se produit un afflux de monocytes-macrophages, la formation de cellules géantes et l'afflux d'un grand nombre de lymphocytes T CD4+ qui crée une induration dermique. La lecture du diamètre d'induration se fait entre 48 et 72 heures après injection de la tuberculine [415]. La réaction a tendance à être plus tardive en cas de contact récent avec une souche sauvage ou vaccinale (jeune enfant). Chez l'enfant de moins de 15 ans, l'interprétation de la mesure dépend du contexte et du statut vaccinal, elle est résumée dans le Tableau 3.2 [416].

Tableau 3.2 : Interprétation de l'IDR selon le statut vaccinal chez l'enfants moins de 15 ans [416].

	< 5 mm	5-9 mm	10-14 mm	≥ 15 mm
BCG datant de moins de 10 ans	IDR Négative	IDR post-vaccinale	Zone de doute	IDR positive
Non vacciné, ou BCG > 10 ans	IDR Négative	Zone de doute	IDR positive	IDR positive
Tous les enfants				Virage=augmentation ≥ 10 mm IDR à au moins de 2ans d'intervalle= infection tuberculeuse
Tous les enfants	IDR phlycténulaire= infection tuberculeuse			

IDR : intradermo-réaction

➤ Chez le bovin

L'intradermo-tuberculation est le test standard pour détecter la tuberculose chez les animaux vivants et l'outil de dépistage de base actuellement disponible pour le bétail [18]. Elle consiste en une injection intradermique d'un dérivé de protéines purifiées (PPD) de *M. bovis* ou *M. avium*, lorsqu'un animal est infecté une réaction d'hypersensibilité retardée aux antigènes utilisés provoque un épaissement de la peau à l'endroit de l'injection [417]. Cette épreuve est habituellement réalisée au milieu de l'encolure, mais peut aussi être réalisée au pli caudal [16]. La réaction est locale, tardive (début après 24 à 48 heures), progressive et durable, c'est pourquoi la lecture du test se fait 72 heures après l'injection [418].

Elle est considérée comme un test intradermique simple lorsque la tuberculine bovine est utilisée seule, et un test intradermique comparatif si les tuberculines bovine et aviaire sont toutes les deux utilisées en même temps [18].

- Intradermo-tuberculation simple (IDS)

L'IDS consiste à injecter dans l'épaisseur du derme de l'encolure une certaine quantité de tuberculine bovine, et apprécier au bout de 72 heures, la réaction obtenue au point d'inoculation (Cf. tableau 3.3). Elle est utilisée dans les opérations de prophylaxie des cheptels en zone indemne ou lors des contrôles à l'introduction [418].

Tableau 3.3 : Valeurs des épaissements du pli de peau prise en compte pour le résultat d'une IDS [418].

Épaissement	Résultat du test IDS
< 2 mm	Négatif
2 < épaisseur < 4 mm	Douteux
> 4 mm	Positif

L'IDS a une sensibilité individuelle moyenne de 85% [60 - 95 %] et une sensibilité cheptel est proche de 100%. La spécificité de 99% en moyenne [60 - 99%] est relativement bonne [16]. Un résultat positif à la suite d'une IDS nécessite une IDC qui ne peut être réalisée que six semaines pour s'affranchir de toute baisse de réponse induite par celle-ci.

- Intradermo-tuberculation comparative (IDC)

L'IDC consiste en l'injection simultanée de tuberculine bovine et la tuberculine aviaire en deux points distants d'environ dix centimètres l'un de l'autre. Puis en la comparaison de la réaction de l'animal 72 heures plus tard (Cf. tableau 3.4) [418].

Elle est utilisée principalement pour différencier les animaux infectés par *M. bovis* avec ceux sensibilisés à la tuberculine par exposition à d'autres mycobactéries. Elle permet donc de s'affranchir des faux positifs obtenus lors IDS par réaction croisée avec d'autres mycobactéries [418].

Tableau 3.4 : Valeurs des épaissements du pli de peau prise en compte pour le résultat d'une IDC [418].

	Différence d'épaissement	Résultat du test IDC
Si $\Delta B < 2\text{mm}$	Quel que soit $\Delta B - \Delta A$	Négatif
	Si $\Delta B - \Delta A < 1\text{mm}$	Négatif
Si $\Delta B > 2\text{mm}$	Si $1 < \Delta B - \Delta A < 4\text{mm}$	Douteux
	Si $\Delta B - \Delta A > 4\text{mm}$	Positif

ΔB : épaissement cutané au lieu d'injection de la tuberculine bovine

ΔA : épaissement cutané au lieu d'injection de la tuberculine aviaire

L'IDC a une sensibilité plus faible de [52 -100%] avec une valeur médiane de 80%, mais une meilleure spécificité de [78,8 - 100%] avec une valeur médiane de 99,5% que L'IDS [418].

IDR a ses limites, y compris les difficultés dans l'interprétation des résultats et la précision imparfaite du test. Cette performance insuffisante, en particulier lorsque les animaux infectés ne sont pas détectés mais également l'élimination inutile des animaux faux positif peut avoir des graves conséquences sur la gestion des élevages [18].

3.4.3.2.1.2 Tests de libération d'interféron gamma (IGRA)

Ces tests sont basés sur la mesure in vitro de la libération d'interféron gamma par les lymphocytes T sensibilisés envers certains peptides spécifiques du CMT [419] ; [420].

Chez l'homme, les tests IGRA reposent sur la détection de la production d'IFN- γ par les cellules mononuclées sanguines du patient après contact avec des protéines spécifiques de *M. tuberculosis* : ESAT-6, CFP-10 et TB7.7. Ces protéines sont délétées dans les souches de BCG. Deux tests sont commercialisés : le Quantiféron basé sur la mesure de la production in vitro d'IFN- γ par le test Elisa (Quantiféron-TB[®]) et le test appelé T-SPOT-TB[®] basé sur une technique d'ELISPOT quantifiant le nombre de cellules mononuclées sanguines capables de produire de l'IFN- γ en réponse à un contact avec ces différents antigènes.

Ces tests, par rapport à l'intradermoréaction à la tuberculine, sont plus spécifiques (90 à 100 %), reproductibles, et ne nécessitent pas que le patient soit revu à 72 heures [421].

Chez le bovin, L'essai est basé sur la libération d'IFN- γ à partir de lymphocytes sensibilisés pendant une période d'incubation de 16 à 24 heures avec un antigène spécifique tuberculine PPD bovine et avec PPD aviaire (pour effectuer une stimulation comparée) puis une détection quantitative de l'IFN- γ bovin est effectuée avec un ELISA sandwich qui utilise deux anticorps monoclonaux anti-IFN- γ bovin [418].

L'épreuve a une sensibilité élevée comparé à l'épreuve cutanée, mais ne peut faire la distinction entre l'infection tuberculeuse latente et tuberculose maladie tout comme IDR à la tuberculine [422].

Cependant, le dosage de l'IFN- γ n'est pas utilisé en routine pour le diagnostic de la tuberculose bovine, car il exige de livrer les échantillons au laboratoire dans la journée, afin de les analyser à l'aide de techniques relativement complexe et coûteuses [18].

CHAPITRE 4

TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

4.1 Traitement de tuberculose humaine

Le traitement de la tuberculose vise à guérir et à réduire rapidement la transmission de la maladie. La chimiothérapie antituberculeuse préconisée par l'OMS repose sur l'association de plusieurs antituberculeux. Cette association permet de réunir trois propriétés essentielles au traitement : un effet bactéricide (interruption de transmission), un effet stérilisant (prévention de la rechute de la maladie) et un effet préventif pour l'émergence des formes de résistance aux antituberculeux (inhibition de sélection des souches naturellement résistantes) [423].

4.1.1 Médicaments antituberculeux

Le traitement de la tuberculose humaine est constitué des antituberculeux de première, deuxième et troisième ligne selon le degré de sensibilité de la bactérie [314].

4.1.1.1 Molécules de première ligne

- Isoniazide (INH)

L'INH est la pierre angulaire du traitement et doit être inclus dans tous les schémas thérapeutiques, sauf si la souche de *M. tuberculosis* est résistante à l'INH [424]. Il a une activité bactéricide vis-à-vis du CMT (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. Son indication comme traitement curatif dans le cas de tuberculose-maladie et la primo-infection symptomatique ou comme un traitement prophylactique en monothérapie dans le cas de primo-infection tuberculeuse asymptomatique, contact avec un sujet bacillifère, personne à risque d'une réactivation de

l'infection tuberculeuse [97]. L'effet indésirable le plus important de l'INH est l'hépatite, dont le risque augmente avec l'âge [424].

- Rifampicine (RMP)

La RMP est le deuxième agent antituberculeux majeur. Elle a un effet bactéricide par blocage de transcription de génome mycobactérien. La complication la plus importante de la RMP est l'hépatite, qui est généralement cholestatique. Bien que le risque d'hépatite soit plus faible avec la RMP qu'avec l'INH [424].

- Pyrazinamide (PZA)

PZA est un antituberculeux bactéricide sur les bacilles intracellulaires dits « quiescents » et sur les bacilles à métabolisme lent contenus dans le caséum par inhibition de la synthèse des acides gras à chaînes courtes du bacille tuberculeux. Il est utilisé comme traitement curatif dans le cas de tuberculose-maladie et dans le cas de primo-infection symptomatique ou comme traitement prophylactique en association avec la rifampicine : tuberculose-infection asymptomatique chez le patient VIH+ et primo-infection asymptomatique chez le patient VIH+ [97].

- Ethambutol (EMB)

EMB est un antituberculeux synthétique spécifiquement actif sur les mycobactéries par inhibition de la synthèse des acides mycoliques. Il est bactériostatique surtout sur les bacilles extracellulaires. La seule indication de ethambutol est le traitement curatif de la tuberculose active et de la primo-infection symptomatique [97].

- Streptomycine (STM)

STM, le premier médicament antituberculeux majeur, a été rapidement remplacé par l'INH [424]. Elle possède une activité bactéricide mais son utilisation est limitée par des taux de résistance relativement élevés (en particulier dans les pays à forte incidence), l'administration parentérale, la néphrotoxicité et l'ototoxicité. Les effets indésirables sont la néphrotoxicité et l'ototoxicité surtout en cas de traitement prolongé [97].

4.1.1.2 Molécules de deuxième ligne

Les agents de deuxième intention sont moins efficaces ou plus toxiques, ou les deux, que médicaments de première intention. Ceux-ci comprennent l'éthionamide, la cyclosérine, la terizidone, l'amikacine, la kanamycine, la capréomycine, la thiacétazone, l'acide para-aminosalicylique (PAS) [424].

4.1.1.3 Molécules de troisième ligne

L'activité de ces molécules contre *M. tuberculosis* est faible par rapport aux molécules de deuxième intention et ne sont généralement administrés que dans le cas de tuberculose ultrarésistante. Elles comprennent l'amoxicilline-clavulanate, la clarithromycine, la clofazimine et le linézolide [424].

4.1.1.4 Molécules en développement

Plusieurs nouveaux médicaments font actuellement l'objet d'une enquête. Ceux-ci comprennent les oxazolidinones (sutezolid), les nitroimidazoles (le delaminid) et PA-0824 et les diamines (SQ-109) [424].

4.1.2 Schéma thérapeutique

Le schéma thérapeutique varie selon que le patient ait été ou non traité antérieurement mais dans tous les cas, il comprend deux phases distinctes une phase initiale ou intensive qui dure deux mois et qui sert à détruire rapidement les bacilles de *M. tuberculosis*, à prévenir l'apparition de bacilles résistants et à faire disparaître la contagiosité, une phase d'entretien, de durée variable selon la situation clinique. Cette phase sert à stériliser les lésions et prévenir ainsi les rechutes. En pratique, il existe trois situations cliniques nécessitant des schémas thérapeutiques différents : les nouveaux cas, les cas de retraitement, la tuberculose multi ou ultra résistante [425].

4.1.2.1 Schémas thérapeutiques pour les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire

Plusieurs protocoles thérapeutiques ont été validés. Le schéma standard comporte une quadrithérapie (phase initiale) d'une durée de deux mois associant INH, RMP, PZA et EMB puis une bithérapie (phase de continuation) d'une durée de 4 mois, associant INH et RMP. Certains auteurs envisagent une trithérapie lorsque

le risque de résistance est minime. La phase initiale doit être prolongée d'un mois si l'examen direct est encore positif à 2 mois et si le résultat de l'antibiogramme n'est pas encore disponible [426].

La durée du traitement est de 6 mois pour les tuberculoses pulmonaires ainsi que pour les tuberculoses extra-pulmonaires, excepté dans les formes graves de la maladie (méningite, tuberculose osseuse, miliaire) où elle est de 9 à 12 mois [427].

4.1.2.2 Schémas thérapeutiques pour les patients antérieurement traités

Chez tous les patients tuberculeux ayant déjà suivi un traitement, l'historique du traitement antérieur doit être bien documenté afin d'évaluer le risque de résistance. La résistance, notamment une multirésistance étant 5 fois plus fréquente en cas de retraitement que chez les nouveaux cas (15 % contre 3 %). Le traitement antibiotique doit être strictement adapté à la sensibilité des bacilles [426].

4.1.2.3 Schémas de traitement de la tuberculose résistante

L'un des problèmes les plus importants de la lutte contre *M. tuberculosis* dans le monde est le développement de la tuberculose pharmaco-résistante. La tuberculose multirésistante (TB-MR) est définie comme la résistance à au moins l'INH et la RMP, deux des quatre médicaments antituberculeux de première intention. La tuberculose ultrarésistante (TB-UR) est définie comme la TB-MR qui est également résistante à toute fluoroquinolone et à au moins l'un des trois agents injectables de deuxième intention (amikacine, kanamycine ou capréomycine). Un diagnostic précis de la TB-MR et de la TB-UR est essentiel pour une prise en charge réussie des patients et un contrôle de la transmission des organismes résistants [428].

Le traitement de la tuberculose résistante, et en particulier la tuberculose multi-résistante, est encore plus lourd. Il fait appel à des médicaments de deuxième intention qui sont moins efficaces et plus toxiques que les médicaments de première intention. La durée du traitement s'échelonne alors souvent sur plusieurs années. Il peut, à son tour, engendrer des souches ultrarésistantes, voire totalement résistantes, ne répondant plus à aucun médicament antituberculeux disponible [429]. Il faut alors prescrire un protocole thérapeutique long auquel on peut ajouter l'un des nouveaux médicaments (bédaquiline et délamanide) et adapter le

traitement en fonction du résultat de l'antibiogramme élargi et de l'évolution clinique du patient [314].

4.1.3 Suivi du traitement

Un suivi régulier du patient est nécessaire dans le but d'évaluer l'efficacité du traitement et de détecter tout effet indésirable éventuel. La surveillance de l'efficacité du traitement repose sur l'examen clinique, la radiographie du thorax (en fin du traitement) et l'examen bactériologique (réalisé à 2 , 5 et 6 mois du traitement) [426].

4.1.4 Autres formes de traitement

- Corticoïdes : sont indiqués dans les méningites et les péricardites. Chez les enfants, ils peuvent être utilisés dans les miliaires tuberculeuses ou dans des formes ganglionnaires médiastinales obstructives.
- Pyridoxine (vitamine B6) : est indiquée chez les patients à risque (grossesse, alcoolisme, dénutrition, neuropathie préexistante, insuffisance rénale, infection par le VIH) dans le but de prévenir la neuropathie périphérique causée par l'INH.
- Compléments alimentaires : en cas de dénutrition [426].

4.2 Traitement de la tuberculose bovine

Le traitement de la tuberculose bovine par les antituberculeux, particulièrement est très long, couteux et susceptibles de produire des souches résistantes, de plus son résultat est incertain [310]. Par conséquent, le traitement de tuberculose bovine est interdit dans la plupart des pays [18].

4.3 Prophylaxie

4.3.1 Prophylaxie de la tuberculose humaine

La prévention de la tuberculose humaine revient à diminuer le réservoir humain du *M. tuberculosis* et à éviter sa transmission [430].

La diminution du réservoir revient à traiter les patients infectés par le bacille tuberculeux [430]. Le traitement préventif (chimio-prévention) de la tuberculose est

la principale intervention sanitaire disponible pour réduire le risque qu'une infection tuberculeuse latente évolue vers une tuberculose active. OMS recommande de fournir un traitement préventif contre la maladie aux personnes vivant avec le VIH, aux personnes vivant au contact de personnes atteintes de tuberculose pulmonaire confirmés bactériologiquement dans leur foyer et aux groupes exposés à un risque clinique (par exemple, les patients sous dialyse) [431].

La prévention de la transmission peut se résumer en deux points :

✚ Diminution du risque du contact potentiel avec le bacille

Par des mesures visant le patient potentiellement contaminant et les sujets en contact avec lui. Les mesures d'isolement respiratoire s'imposent pour toute tuberculose bacillifère, confirmée ou suspectée afin de limiter la transmission par voie aérienne. Ces mesures sont à maintenir jusqu'à l'obtention de signes objectifs d'amélioration clinique, et jusqu'à la disparition ou la réduction de la concentration de BAAR à l'examen direct des expectorations.

Dès la confirmation d'un cas de tuberculose, une enquête sur les sujets contacts doit être débutée afin d'identifier les sujets infectés ou malades. Elle repose sur la recherche d'une infection tuberculeuse chez tout sujet en contact avec un sujet connu ou suspecté de maladie tuberculeuse active, ou présentant des anomalies suggérant une maladie tuberculeuse ancienne, insuffisamment traitée, ayant récemment migré d'une zone de haute endémie tuberculeuse, peu médicalisé, exposé professionnellement (personnel médical et non médical des établissements de soins, de retraite, des asiles et des lieux de détention) [432]

✚ Diminution du risque de développement d'une infection tuberculeuse par la vaccination.

La vaccination antituberculeuse est le moyen le plus efficace de prévenir et de contrôler la tuberculose. Il existe deux classes des vaccins antituberculeux, vaccins thérapeutiques pour traiter les patients tuberculeux et vaccins préventifs pour prévenir l'infection à CMT et le développement de la tuberculose maladie [433].

Actuellement, le seul vaccin préventif homologué contre la tuberculose c'est le vaccin BCG [434]. Il est constitué de bacilles tuberculeux bovins atténués obtenu

par 230 transferts successifs de la bactérie pathogène sur un milieu de culture à base de pomme de terre glycéinée mélangé avec de la bile. L'injection intradermique de ce vaccin induire la sécrétion d'IgG et d'IgM reconnaissant plusieurs antigènes mycobactériens. Certains de ces anticorps pourraient améliorer l'immunité cellulaire et humorale contre l'infection à *M. tuberculosis* sur la base de divers mécanismes, y compris l'accélération de la fusion phagolysosomale, favorisant la clairance des antigènes immunomodulateurs et influençant l'issue de l'infection mycobactérienne grâce à leur capacité à moduler l'inflammation [435]. Cette vaccination confère une protection chez les nourrissons et les jeunes enfants contre l'infection tuberculeuse et prévient les formes graves telles que la tuberculose disséminée et la méningite tuberculeuse. Tandis que sous efficacité contre la tuberculose pulmonaire, chez les adultes n'atteint guère qu'environ 50% [436].

Cependant, le vaccin BCG ne stimule pas efficacement les lymphocytes T (en particulier les lymphocytes T CD8), et l'effet immuno-protecteur de la vaccination ne persiste que pendant 10 à 15 ans. Pour pallier cette protection insuffisante conférée par le vaccin BCG, de nombreux vaccins candidats susceptibles plus efficaces sont en cours de développement [434].

À l'heure actuelle, 25 nouveaux vaccins antituberculeux sont en cours d'évaluation dans le cadre d'essais cliniques, dont trois (*Vaccae* chez les patients atteints d'une infection tuberculeuse latente, *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) / Mw et VPM1002) ont atteint les essais cliniques de phase III. Trois vaccins (*Vaccae*, *Utilins* et BCGPSN) ont obtenu des certificats d'enregistrement de la China Food and Drug Administration et ont été largement utilisés pour traiter la tuberculose en Chine. Ces vaccins peuvent être divisés en cinq catégories : les vaccins inactivés, les vaccins vivants recombinants (vaccins mycobactériens recombinants, vaccins bactériens recombinants et vaccins à virus vivants), les vaccins vivants atténués, les vaccins antituberculeux sous-unitaires et les vaccins à ADN [434].

4.3.2 Prophylaxie de la tuberculose bovine

Le contrôle et l'éradication de la tuberculose bovine constituent un objectif souhaitable à la fois du point de vue de la santé animale et en raison des implications zoonotiques de *M. bovis* [18].

4.3.2.1 Prophylaxie médicale

Pour prévenir la tuberculose bovine, plusieurs vaccins ont été testés, dont le BCG, mais aucun ne s'est avéré efficace [310]. Actuellement, grâce la recherche avancée sur le séquençage de *M. bovis*, il devient possible de concevoir et de développer des vaccins efficaces contre les mycobactéries et des stratégies de vaccination pour prévenir ou contrôler la tuberculose bovine chez les bovins ou les animaux sauvages [18].

4.3.2.2 Prophylaxie sanitaire

4.3.2.2.1 Mesures défensives

Elles visent la protection des effectifs indemnes et maintien la qualification indemnes de la tuberculose bovine. Elles sont basées sur :

- Le contrôle d'importation des animaux provenant d'un pays reconnu endémique de la tuberculose bovine ;
- Limitation des contacts direct ou indirect entre les élevages bovins reconnus infectés ou l'état sanitaire inconnu (les pâturages communs, le prêt et la mise en pension des bovins sont à proscrire) ;
- Le contrôle et la mise en quarantaine des animaux introduits dans un élevage indemne [16].

4.3.2.2.2 Mesures offensives

Elles sont fondées sur le dépistage et l'assainissement des élevages bovins tuberculeux, assortis d'une désinfection et repeuplement des étables.

- Dépistage et assainissement de l'élevage infecté

Les troupeaux étaient testés en utilisant l'intradermo-tuberculination et les animaux réagissant positivement étaient immédiatement retirés du troupeau et réformés. Un contrôle après une période fixée (généralement 6 mois), jusqu'à ce qu'aucune réaction positive ne soit détectée et qu'aucun tubercule ne soit observé chez des animaux à l'abattoir [18]. Bien que la mise en œuvre régulière de ces

mesures de contrôle ait réussi à éradiquer ou réduire significativement la tuberculose bovine dans le cheptel bovin de nombreux pays développés. Cependant, elles ne sont pas toujours abordables et peuvent ne pas être applicables dans les pays en développement, en raison du manque des ressources financières pour une indemnisation adéquate et rapide des éleveurs pour les pertes due à l'élimination des animaux infectés. Dans certains cas, la politique de test et d'abattage est en place, mais elle n'est pas toujours mise en œuvre de manière rigoureuse, et les animaux réagissant positivement ne sont pas toujours effectivement mis en quarantaine ou abattus [18].

- Traçabilité

Lorsqu'un foyer de tuberculose bovine est identifié, une enquête épidémiologique est conduite en amont afin d'identifier l'origine de la contamination du foyer et en aval pour cibler les élevages susceptibles d'avoir été contaminés à partir du foyer [16].

- Nettoyage et désinfection

Une fois l'assainissement de l'élevage est terminé, le nettoyage et la désinfection de l'étable sont nécessaires afin d'éviter la propagation des mycobactéries [16].

- Repeuplement et requalification

Le repeuplement ne peut être entrepris qu'après assainissement réel et avec des animaux indemnes. Enfin, la requalification du cheptel doit être suivie d'un protocole de surveillance rapprochée, de façon à assurer une maîtrise satisfaisante du risque de résurgence ou de récurrence [16].

4.3.3 Prophylaxie de la tuberculose zoonotique

La prévention et le contrôle de la tuberculose zoonotique nécessite une approche intersectorielle et multidisciplinaire, reliant la santé animale, humaine et la sécurité alimentaire. L'approche de la santé globale « One Health » est de plus en plus approuvée par de nombreuses organisations de premier plan (l'Organisation Mondiale de la Santé, de l'Organisation de l'Alimentation et

l'Agriculture et de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale avec l'Union internationale contre la Tuberculose et les Maladies respiratoires) pour s'attaquer de manière globale aux défis qui se posent à l'interface animal-homme [437]. Sur la base du concept « One health », la lutte contre la tuberculose zoonotique est basée sur trois piliers qui consistent à améliorer la base de données scientifiques, à réduire la transmission de la maladie à l'interface animal-homme et en renforçant la collaboration intersectorielle :

- ✚ L'amélioration de la base des données scientifiques : peut être obtenue en collectant, analysant et enregistrant des données de meilleure qualité sur la maladie, en améliorant la surveillance et en signalant la tuberculose bovine chez l'homme, les bovins et la faune sauvage. Pour une meilleure documentation de la tuberculose zoonotique, les pays devraient s'efforcer d'intégrer la tuberculose zoonotique dans leurs activités de surveillance de routine. Une meilleure détection des cas nécessite des laboratoires qui ayant un accès à des outils de diagnostic précis et rapides, associés à des systèmes d'enregistrement et de notification fiables, basés sur les cas et de préférence électroniques.
- ✚ La transmission de la tuberculose zoonotique à l'interface animal-homme peut être réduite en développant des stratégies de lutte contre la tuberculose bovine, améliorer la sécurité alimentaire par la pasteurisation du lait et l'inspection sanitaire de tous les animaux entrant dans la chaîne alimentaire et enfin identifier les facteurs de risques et les voies de transmission par l'utilisation de technologies modernes telles que le séquençage, la métagénomique et les analyses phylogénétiques.
- ✚ La collaboration intersectorielle peut être réalisée en adoptant une approche « One Health ». Les secteurs les plus pertinents sont le secteur de la santé humaine, le secteur de la santé animale, les autorités chargées de la protection de la faune, les autorités de sécurité sanitaire des aliments, les organisations agricoles et commerciales, les groupes de consommateurs, les organismes d'enseignement et les institutions financières. Cette approche prévoit que tous les secteurs concernés devraient travailler ensemble pour

développer la législation et les politiques, concevoir et mettre en œuvre des stratégies de contrôle [438].

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 05

INSPECTION SANITAIRE ET ANALYSE BACTERIOLOGIQUE

5.1 Introduction

La tuberculose est l'une des maladies infectieuses les plus répandues dans le monde et demeure un problème majeur de la santé humaine et animale, notamment dans les pays en développement.

En Algérie, la tuberculose est une maladie endémique aussi bien chez l'homme que les bovins. Chez les bovins, la maladie est contrôlée par la Direction des Services Vétérinaires, dont la surveillance repose sur des dispositifs qui ne permet qu'une suspicion sans aucune investigation bactériologique. Dans ce contexte, nous avons mené une étude dans quatre abattoirs de la région Centre de l'Algérie, dont les objectifs sont :

- Estimation de la prévalence de la tuberculose bovine dans quatre abattoirs de la région Centre de l'Algérie ;
- Evaluation de quelques facteurs du risque influençant la prévalence de la tuberculose bovine ;
- Mettre en évidence les agents responsables de la maladie à l'aide des outils bactériologiques.

En parallèle, nous avons mené une étude prospective sur des souches mycobactériennes isolées chez l'homme dans deux centres de diagnostic bactériologique de la tuberculose.

5.2 Cadre d'étude

La présente étude a été effectuée dans deux wilayas à vocation pastorale dans la région centre d'Algérie, sur une période de deux ans du novembre 2017 au novembre 2019. La wilaya de Béjaia est située au Nord du pays (36 ° 45 '00 "N, 5 ° 04' 00" E ; 262,19 habitants / km²) à environ 247 Km de la capitale Alger au climat

méditerranéen. La wilaya de Sétif est la capitale des hauts plateaux du Nord-Est de l'Algérie (36 ° 09 '00 "N, 5 ° 26' 00" E ; 229 habitants / km²) à environ 268 km de la capitale Alger au climat semi-aride (Cf. figure 5.1). D'après le recensement de l'année 2018, Béjaïa et Sétif compte respectivement 978 050 et 1 489 495 habitants. Les deux wilayas sont connues par leur activité agricole notamment l'élevage des bovins. A noter que plus de 70% du cheptel bovin se trouve dans la région Nord de l'Algérie.

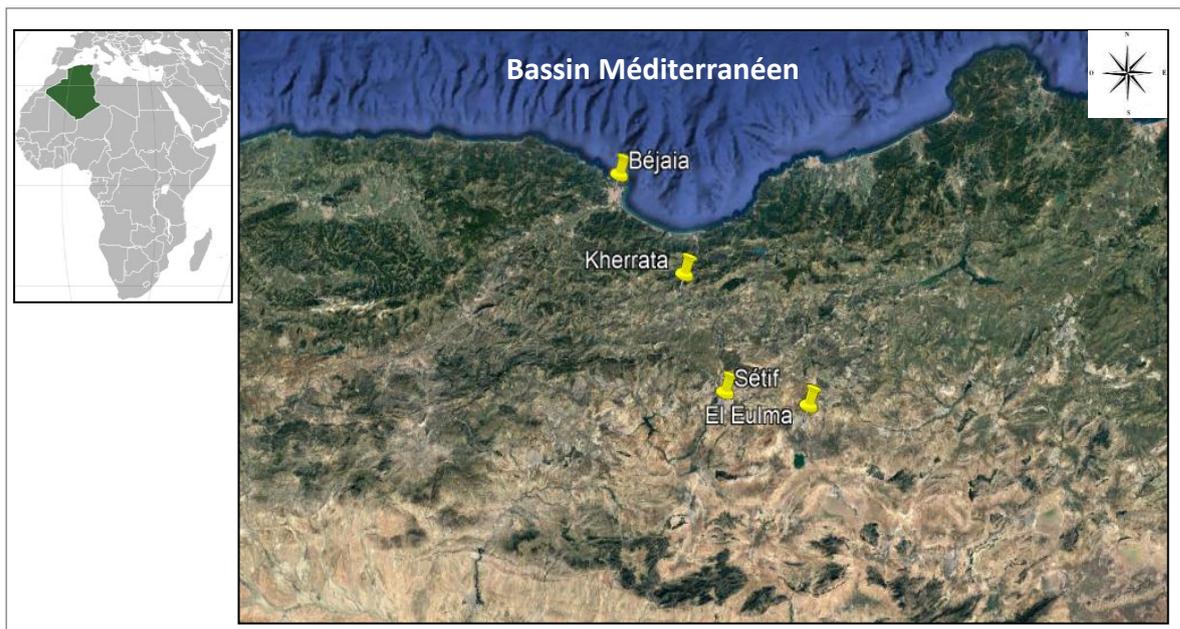


Figure 5.1 : Distribution géographique de la zone d'étude dans les deux wilayas (Béjaïa et Sétif). Les sites d'échantillonnage sont indiqués en jaune.

La collecte des échantillons humains a été effectuée dans le Service de Contrôle de la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (SCTMR) de la wilaya de Béjaïa et Sétif. Tandis que les échantillons bovins ont été collectés dans quatre abattoirs communaux à savoir : Kherrata et Béjaïa (W. Béjaïa) ; El-Eulma et Sétif (W. Sétif).

5.3 Matériel et Méthodes

5.3.1 Collecte d'échantillons

5.3.1.1 Echantillons d'origine humaine

Il s'agit des souches mycobactériennes isolées dans deux centres de diagnostic bactériologique de la tuberculose à savoir SCTMR de Béjaia et Sétif. Ces isolats ont été obtenus à partir d'un total de 1 952 patients suspects de toutes formes de tuberculose. Les échantillons humains ont été préalablement examinés selon la méthode microbiologique standard (examen microscopique par coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) et culture sur milieu Lowenstein-Jensen (L-J)). Au total, 115 cas de tuberculose confirmés par culture ont été inclus dans cette étude. Les données démographiques (âge et sexe) et les résultats du laboratoire (coloration au ZN, culture, types d'échantillons) ont été recueillis à partir du registre médical.

5.3.1.2 Echantillons d'origine bovine

La population d'étude est constituée par des bovins abattus dans quatre abattoirs situés dans la région Centre de l'Algérie. Au total, 3 546 bovins ont été soumis à une inspection sanitaire dans quatre abattoirs communaux à savoir : Béjaia (n = 2 460), Kherrata (n = 650), Sétif (n = 120) et El-Eulma (n = 316).

- Inspection *ante-mortem*

Elle consiste à réaliser un examen clinique et une identification de chaque animale. Les informations recueillies telles que l'âge, le sexe et la race ont été enregistrées sur une fiche de renseignement.

- Inspection *post-mortem*

Elle consiste à réaliser un examen visuel, une palpation et une incision des organes et ses nœuds lymphatiques, afin de détecter des lésions suspectes de la tuberculose bovine, qui correspondent à des tubercules des tailles différentes allant de taille de grain de millet « tuberculose miliaire » jusqu'à une taille plus grosse que le poing. Des nodules présentent parfois sous forme d'un collier de perle : « tuberculose perlée ». Le tubercule présente en général une couleur blanc-jaunâtre à un gris-verdâtre et son intérieur est caséifié, casei-calcifié, il peut parfois

présenter un aspect purulent. Les organes et les nœuds lymphatiques dont l'examen est systématique sont :

- Nœuds lymphatiques de la tête (retro-pharyngiens, sous maxillaires et parotidiens) ;
- Trachée, poumons ses nœuds lymphatiques (bronchiques et médiastinaux) ;
- Foie et ses nœuds lymphatiques (rétro-hépatique et pancréatique) ;
- Tractus digestif et ses nœuds lymphatiques (stomacaux et mésentériques).

La découverte des lésions suspectes de la tuberculose bovine dans l'un de ces organes, doit conduire à une recherche plus approfondie sur la carcasse et cinquième quartier. La sanction de la saisie est en fonction de la localisation et de la nature des lésions :

- La saisie partielle lorsque des lésions non évolutives sont observées avec une localisation sur un seul organe porte d'entrée (tête, poumons, foie, tractus digestif) et les ganglions satellites. La saisie concerne alors le territoire drainé correspondant.
- La saisie totale lorsque des lésions présentant un fort potentiel de dissémination de bacilles dans l'organisme c'est-à-dire lors de lésions à localisation multiples (diffusion tissulaires : atteintes des séreuses ou diffusion par voie sanguine : atteintes des organes filtres tels que les reins et la rate) ou lors de lésions signalant une généralisation (lésions miliaires, nécrose de caséification diffuse et la tuberculose chronique d'organe associée à des foyers congestifs, hémorragiques et parfois de ramollissement.

5.3.2 Acheminement et conservation des prélèvements

Le matériel biologique est constitué à des tubercules ou des nœuds lymphatiques présentant des lésions suspectes de la tuberculose bovine. Ces échantillons ont été prélevés dans des pots stériles étiquetés. Les échantillons

tissulaires ainsi collectés ont été transportés sous glace (+4°C) au SCTMR de Béjaia où ils ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse bactériologique.

5.3.3 Examen bactériologique

5.3.3.1 Préparation d'échantillon tissulaire

Tous les échantillons ont été homogénéisés avant l'examen bactériologique. Environ 5 g de chaque échantillon ont été coupés dans une boîte de Pétri stérile à l'aide d'une lame et d'une pince stériles pour obtenir des pièces fines (Cf. figure 5.2.A), et homogénéisés à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles (Cf. figure 5.2.B). Le broyat obtenu est servi pour la bactérioscopie et la culture bactérienne.

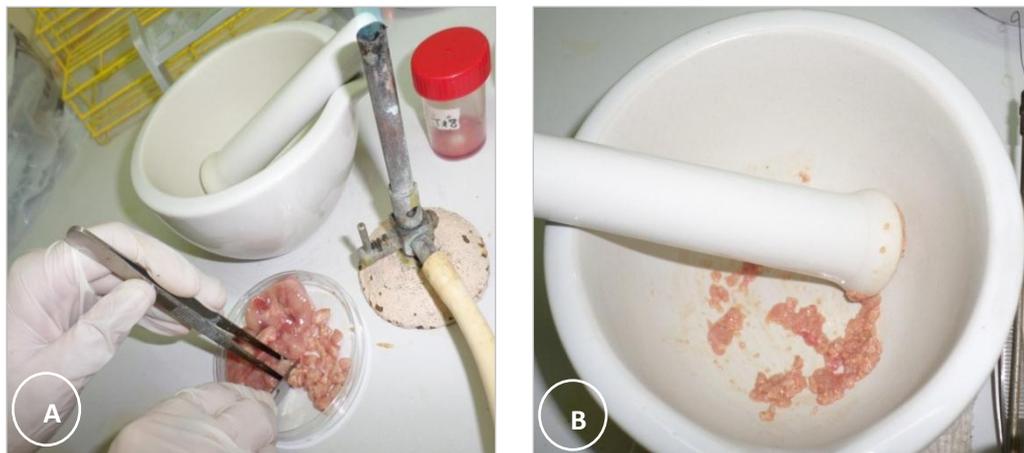


Figure 5.2 : Préparation d'échantillon. A) Dissection du tissu ; B) Broyage du tissu en pièces fines (Photo personnelle, 2018).

5.3.3.2 Examen direct (microscopie) : Coloration de Ziehl-Neelsen

Observation directe des bacilles sur des broyats d'organe repose sur la propriété d'Acido-Alcool-Résistance de la paroi des mycobactéries.

A partir de broyat et à l'aide d'une anse de platine rigide, une parcelle d'échantillon est prélevée. Le contenu de l'anse est étalé en couche mince et homogène du centre de la lame qu'est préalablement identifié sur au moins 2/3. Les frottis ont été séchés à l'air pendant 15 minutes, puis fixés à chaud par 3 ou 4 passages rapide au-dessus de la flamme de bec de bunsen.

Pour la coloration de Ziehl – Neelsen, les frottis ont été recouverts de la fuchsine phéniquée filtré sur un papier et ont été chauffés jusqu'à l'apparition de la vapeur toutes les 3 min pendant 10 min, en évitant le dessèchement du colorant. Par la suite, les frottis ont été rincés avec de l'eau ordinaire, puis décolorés par l'action combinée de l'acide sulfurique à 25% (3 min) et l'alcool éthylique à 95 °C (5 min) et recolorés par le bleu de méthylène 0,1% pendant 30 secondes à 1 min (Cf. figure 5.3). Enfin, les frottis rincés et séchés ont été examinés avec l'objectif à l'immersion (x100).

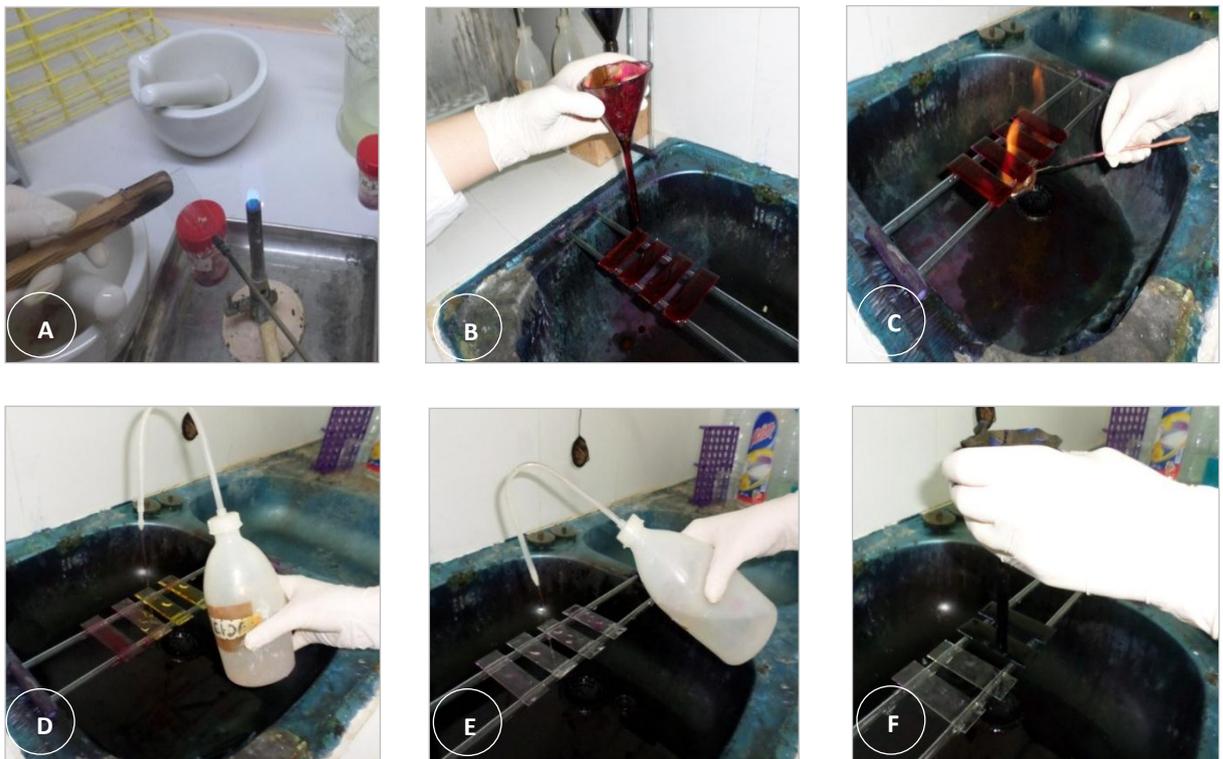


Figure 5.3 : Etapes de la coloration ZN. A) Confection du frottis ; B) et C) coloration par la fuchsine à chaud ; D) et E) Décoloration par acide et l'alcool ; F) Contre coloration par le bleu de méthylène (Photo personnelle, 2018).

5.3.3.3 Lecture des frottis et interprétation des résultats

La lecture microscopique de chaque frottis a été faite avec une procédure qui permettrait de parcourir toute la lame, qui correspond à environ 300 champs (trois passages de la lame en longueur). Les BAAR apparaissent sous forme de bâtonnets droits ou incurvés, isolés ou en amas colorés en rose sur un fond bleu

(Cf. figure 5.4). L'interprétation des résultats dépend au nombre des BAAR par rapport aux nombres des champs de lecture (Cf. Appendice D).

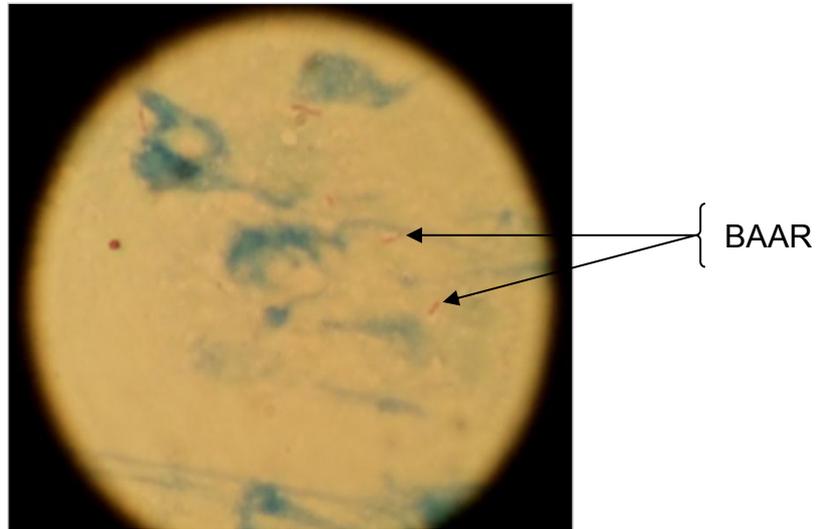


Figure 5.4 : Aspect microscopique des BAAR colorés par ZN (Photo personnelle, 2017).

5.3.3.4 Culture bactérienne

L'isolement des mycobactéries par culture, nécessite une étape préalable de décontamination. À cet effet, nous avons utilisé l'une des méthodes celle de Petroff à la soude modifié [338]. En bref, le broyat tissulaire a été transféré dans un tube de centrifugation (10 ml) et décontaminé en ajoutant un volume égal de la soude (NaOH) à 4%. La suspension a été agitée, puis centrifugée à une vitesse 3000 tours/min pendant 15 min. Le surnageant a ensuite été décanté, et le culot résultant a été neutralisé avec 20 ml de l'eau distillée stérile. Une re-centrifugation de la suspension à une vitesse 3000 tours/min pendant 15 min et le culot ainsi obtenu est servi pour ensemencement (Cf. figure 5.5). Environ 0,2 à 0,3 ml de culot a été ensemencé dans deux types milieux solides à savoir : L-J et Coletsos. Les tubes ensemencés ont été incubés à 37 C° pendant 8 à 12 semaines sans les fermer hermétiquement qu'après évaporation du liquide pendant 2 à 3 jours.



Figure 5.5 : Etapes de la décontamination par la soude (Photo personnelle, 2018).

5.3.3.5 Lecture et identification phénotypique

A la fin de la première semaine d'incubation, nous avons observé les tubes afin de constater des contaminations éventuelles (une modification de la couleur du milieu de culture vers le jaune, vert ou marron), et des poussés des mycobactéries atypiques à croissance rapide et la lecture se poursuit ultérieurement à raison d'une fois par semaine.

La croissance de chaque isolat a été confirmée par la présence des BAAR à l'aide de la coloration Ziehl Neelsen. Une fois la culture est positive, nous avons procédé une identification sur la base des caractères cultureux tels que le temps de croissance, morphologie et pigmentation des colonies.

S'il n'y a pas développement des colonies après 12 semaines d'incubation, la culture a été déclarée négative.

5.4 Analyses statistiques

Les données recueillies durant notre enquête, ont été saisies dans un tableur Microsoft Excel 2016 afin de calculer les pourcentages et d'élaborer les graphiques pour la présentation des résultats. Le test Chi-2 d'homogénéité a été utilisé afin de comparer la différence des prévalences de la tuberculose bovine dans les quatre abattoirs, d'évaluer l'influence des facteurs du risque sur la prévalence ainsi pour comparer la variabilité de distribution des espèces CMT isolées chez l'homme selon

la forme de la maladie et la région. Les valeurs $P < 0,05\%$ ont été considérées comme significatives. Les odds ratios (OR) et l'intervalle de confiance à 95% ont été calculés pour estimer l'association entre ces variables et la tuberculose.

5.5 Résultats

5.5.1 Inspection *post-mortem*

5.5.1.1 Prévalence des lésions suspectes de la tuberculose bovine selon les facteurs du risque dans les quatre abattoirs

L'inspection sanitaire des viandes effectuée sur un total 3 546 bovins a montré une prévalence de lésions suspectes de la tuberculose bovine de 6,5%. Représentant respectivement 5,4% (35/650), 6,1% (150/2460), 7,3% (23/316) et 20% (24/120) des bovins des abattoirs de Kherrata, Béjaia, El-Eulma et Sétif. L'analyse statistique a montré une variabilité interrégionale ($p < 0,0001$), la prévalence la plus élevée a été enregistrée dans l'abattoir de Sétif comparée aux autres abattoirs (Cf. tableau 5.1).

Tableau 5.1 : Répartition de la prévalence des lésions suspectes de la tuberculose bovine dans quatre abattoirs de la région Centre de l'Algérie (2017-2019).

Abattoirs	Nbr. Bovins inspectés	Nbr. (%) Carcasses présentant des lésions	Nbr. (%) Cultures positives
Béjaia	2,460	150 (6,1)	122 (81,3)
Kherrata	650	35 (5,4)	17 (48,6)
El-Eulma	316	23 (7,3)	23 (100)
Sétif	120	24 (20)	19 (79,2)
Total	3,546	232	181

OR 3,87
(95 % CI
2,42- 6,18)
 $p < 0,0001$

Nbr : nombre ; % : pourcentage.

Nos résultats montrent que les femelles ont été les plus affectées par rapport aux mâles (17% contre 6%, $p = 0,00001$). Les bovins les plus âgés présentaient un risque élevé pour l'infection par la tuberculose que les bovins jeunes (27,2% contre

5,4%, $p= 0,00001$). Les bovins de la race croisée et importée ont été les plus fréquemment affectés par rapport à la race locale ($P= 0,001$) (Cf. tableau 5.2).

Tableau 5.2 : Prévalence des lésions suspectes de la tuberculose bovine selon l'âge, le sexe et la race.

	Paramètres	Nbr. Bovins inspectés	Nbr. (%) carcasses suspectes de TB
Age	< 2 ans	2733	148 (5,4%)
	2-5 ans	769	72 (9,4%)
	>5 ans	44	12 (27,3 %)
Sexe	Mâle	3380	204 (6%)
	Femelle	166	28 (17%)
Race	Croisée	2412	172 (7,1%)
	Locale	712	26 (3,6%)
	Importée	422	34 (8,1%)

5.5.1.2 Distribution des lésions suspectes de la tuberculose bovine par organe

Nos résultats montrent que les lésions suspectes de tuberculose bovine ont été détectées presque dans tous les organes. Environ, 66,8% de ces lésions étaient localisées dans le tissu et/ou les nœuds lymphatiques pulmonaires, tandis que 28,9% des bovins présentaient des lésions concomitantes dans les poumons et les organes extra-pulmonaires (foie, tête, cœur, cavités abdominales et thoraciques, thymus, organes génitaux femelles et mâles, nœuds lymphatiques pré-scapulaires et pré-cruraux etc.) (Cf. figure 5.6 et 5.7 ; tableau 5.3) et 4,3% des bovins infectés avaient une tuberculose généralisée (Cf. figure 5.8 et tableau 5.3).

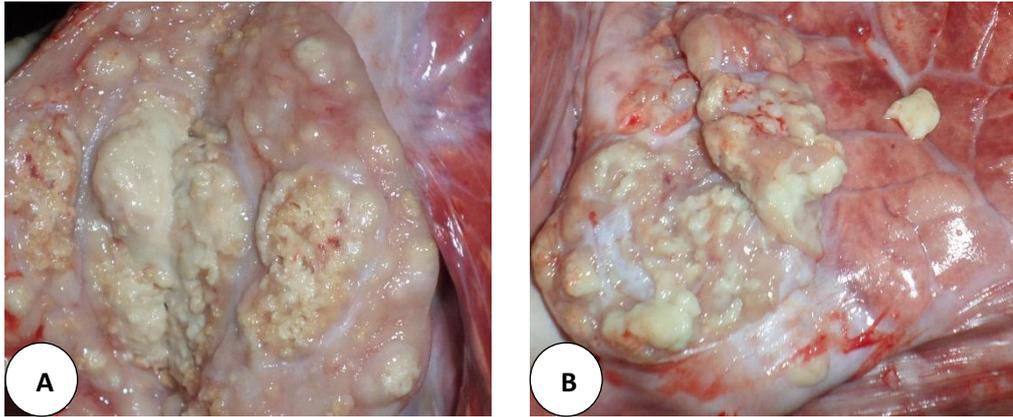


Figure 5.6 : Atteinte tuberculeuse du NL et tissu pulmonaire. **A)** Lésion caséo-calcaire du NL médiastinal crânial. **B)** Nombreux tubercules pleins du caséum au niveau du tissu pulmonaire (Photo personnelle, 2018).

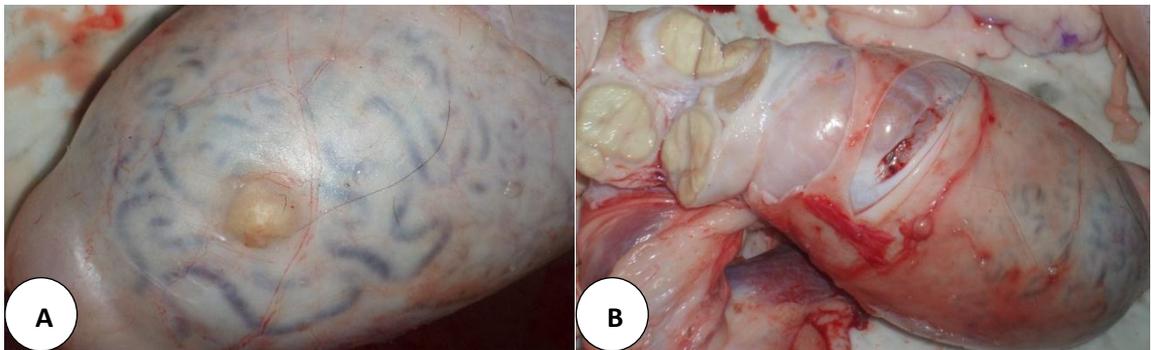


Figure 5.7: Granulome tuberculeux rond avec une nécrose caséuse sèche au niveau du tissu (**A**) et NL du testicule (**B**) (Photo personnelle, 2017).

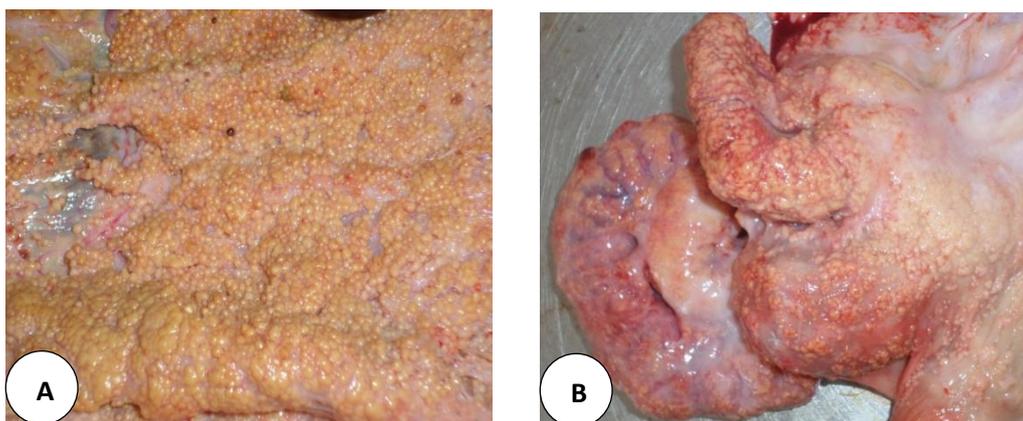


Figure 5.8 : Nombreux petits tubercules de couleur jaune à gris-rougeâtre au niveau de la plèvre pariétale et l'utérus d'une vache âgée plus de 5 ans (Photo personnelle, 2018).

Tableau 5.3 : Distribution des lésions suspectes de la tuberculose bovine dans différents organes.

Tissus/ organe	Nbr. Carcasses
NL/ Tissu pulmonaire	155
Poumons + foie (NL)	27
Poumons et/ ou foie + tête (NL)	14
Poumons et/ou foie + intestin (NL)	6
Poumons + pré-scapulaire ou pré-crural (NL)	6
Poumons (NL) + cavité thoracique	4
Pulmonaire	
Poumons et/ manubrium+ tête+ foie+ intestin (NL)	3
+	
Extra-pulmonaire	
Poumons et/ ou tête+ intestin+ pré-crural+ manubrium (NL)	2
Poumons et/ ou rognons blancs+ foie+ pré-crural (NL)	2
Poumons et/ ou foie+ tête+ pré-scapulaire+ intestin (NL)	1
Poumons (NL) + cœur	1
Poumons + manubrium (NL) + cavité thoracique+ thymus	1
Tuberculose généralisée	08
Atteinte génitale (associée avec TB généralisée)	02

Nbr : Nombre ; **NL** : Nœud lymphatique ; **TB** : Tuberculose.

5.5.2 Examen bactériologique

5.5.2.1 Echantillons d'origine bovine

La microscopie de 232 échantillons a révélé la présence des BAAR dans 73 échantillons, soit un taux de positivité de 31,5%. Tandis que la culture a révélé 181 (78%) cultures positives (Cf. figure 5.9.A), 45 (19,4%) cultures négatives et six (2,6%) cultures contaminées (Cf. figure 5.9.B) ; (Cf. tableau 5.4).

Tableau 5.4 : Résultats de la microscopie et la culture.

Test	Echantillon positif	Echantillon négatif	Echantillon contaminé	Total	Taux de positivité (%)
Microscopie	73	159	-	232	31,5
Culture	181	45	06	232	78



Figure 5.9 : Aspect des cultures des mycobactéries sur milieu L-J. **A)** Cultures positives ; **B)** cultures contaminées (virage de couleur de milieu L-J vers l'orange) (Photo personnelle, 2018).

5.5.2.2 Echantillons d'origine humaine

A total, 115 cas de tuberculose humaine ont été confirmés par culture (Cf. figure 5.10), 87 cas provenant du SCTMR de Béjaïa (échantillonnage sur 2 ans) et 28 cas de Sétif (échantillonnage sur 1 an). Parmi ces cas, 83 (72,2%) ont été isolés à partir d'échantillons pulmonaires (51 expectorations, sept liquides d'aspiration bronchique et 25 liquides d'aspiration gastrique) et 32 (27,8%) d'échantillons extra-pulmonaires (18 biopsies pleurales, 01 biopsie intestinale, 09 liquides pleuraux, 02 pus et 02 liquide céphalo-rachidien). Soixante-cinq patients étaient des hommes (sex-ratio 1,3) avec une tranche d'âge comprise entre 18 à 97 ans (Cf. tableau 5.5).



Figure 5.10 : Aspect des colonies du *M. tuberculosis* sur L-J (Photo personnelle, 2019).

Tableau 5.5 : Caractéristiques démographiques et cliniques des patients tuberculeux.

Paramètres		Nbr. (%) Cas de TB humaine
Sexe		
Homme		65 (56,5)
Femme		50 (43,5)
Tranche d'âge		
< 20 ans		3 (2,6)
21-60 ans		60 (52,2)
> 60 ans		24 (20,9)
Non déterminé		28 (24,3)
Microscopie		
Forme pulmonaire	Positive	24 (28,9)
	Négative	59 (71,1)
Forme extra-pulmonaire	Positive	1 (3,1)
	Négative	31 (96,9)

5.6 Discussion

Chez les bovins, l'inspection *post-mortem* est une méthode rentable de surveillance passive de la tuberculose bovine. Dans notre étude, la prévalence des carcasses présentant des lésions suspectes de tuberculose bovine (6,5%) est

élevée par rapport aux données précédemment rapportées en Algérie (3,6% en 2007) [5]. Cette valeur est également supérieure aux valeurs rapportées dans les pays voisins, comme le Maroc (3,7%) et la Tunisie (3,2%) [176] ;[439]. Cependant, elle est inférieure aux valeurs rapportées dans d'autres pays africains, tels que Nigéria (9,3%) et Mali (11,9%) [440] ;[175]. Cette variation pourrait s'expliquer par de nombreux paramètres considérés comme des facteurs du risque de tuberculose bovine, tels que l'âge, le sexe, la race, le statut immunitaire, etc. [163].

La variabilité interrégionale de la prévalence de la tuberculose bovine dans notre étude pourrait être liée à une différence dans la structure de population bovine dans les abattoirs inclus. Dans la présente étude, la prévalence la plus élevée était significativement associée à l'âge (bovins ayant >5 ans par rapport aux d'autres classes d'âge), au sexe (femelles > mâles) et à la race (races croisées et importées > locales). En fait, la sensibilité élevée des bovins âgés pourrait s'expliquer par la nature chronique de la maladie, les animaux pourraient avoir contracté l'infection à un jeune âge, mais ne développer la maladie qu'à un âge avancé [441]. Concernant le sexe, de nombreuses études rapportent une prévalence plus élevée de la tuberculose bovine chez femelles que chez les mâles [283] ;[177] et cela peut s'expliquer par le fait que les vaches restent plus longtemps dans les troupeaux pour la production laitière tandis que les autres catégories sont abattues à jeune âge [177]. De plus, le stress dû à la période de gestation et de lactation rend les vaches plus vulnérables à l'infection [181]. Pour la race bovine, de nombreuses études africaines suggèrent que la race importée (européenne) ainsi la race croisée peuvent être plus sensibles à l'infection que la race locale. Ce qui est probablement lié à des différences du mode d'élevage [442];[288].

Environ 95,7% (222/232) des lésions se sont produites dans le tissu pulmonaire et / ou les ganglions lymphatiques, dont 69,8% étaient confinés aux poumons et 30,2% étaient associés à des organes extra-pulmonaires. La plupart des études ont rapporté que les lésions tuberculeuses chez les bovins se trouvent souvent dans les poumons [440] ; [177-179]. En réalité, la voie de transmission détermine la localisation des lésions. Bien que l'inhalation soit la voie d'infection la plus courante, elle provoque des lésions pulmonaires et des ganglions lymphatiques associés [301]. Alors que 4,3% des carcasses présentent des lésions tuberculeuses

généralisées. Cette proportion était plus faible par rapport aux résultats de nombreuses enquêtes menées dans différents pays africains [166];[177] ;[183]. La généralisation peut survenir si la réponse immunitaire initiale est inefficace ou après une réinfection [301]. L'atteinte utérine a été détectée dans 2 cas (0,8%), avec des lésions miliaires. Cette forme de tuberculose peut survenir soit par propagation du bacille à partir d'une péritonite tuberculeuse ou par dissémination sanguine.

La microscopie a révélé un faible taux de positivité par rapport à la culture (31,5% contre 78%). De nombreux auteurs ont signalé la faible sensibilité et spécificité de la microscopie [329] ;[413]. Tandis que, l'isolement des mycobactéries par culture est « Gold standard » pour le diagnostic du CMT, compte tenu de sa haute spécificité. Cependant, il peut occasionnellement produire des faux négatifs et sa sensibilité n'a atteint que 80% [400]. Le taux de détection par culture peut être réduit en raison de la procédure de décontamination appliquée ou des conditions de stockage des échantillons, affectant la viabilité des mycobactéries [443]. Dans notre étude, en raison de contraintes logistiques, les échantillons d'origine bovine ont été conservés à -20 ° C pendant un maximum de cinq semaines avant la mise en culture, ce qui peut interférer avec la viabilité des mycobactéries.

5.7 Conclusion

Cette étude vient de confirmer que la tuberculose bovine reste une pathologie importante dans la wilaya de Béjaia et Sétif avec une prévalence globale de 6,5%. Nos résultats montrent que le risque d'infection tuberculeuse est accru chez les femelles les plus âgées.

Par ailleurs, l'analyse bactériologique a permis de confirmer les cas suspects de la tuberculose bovine. La culture a confirmé que 78% des bovins sont infectés par des mycobactéries. Une identification moléculaire des souches isolées est nécessaire afin de déterminer les espèces et les génotypes impliqués dans l'infection des bovins dans cette région.

CHAPITRE 06

IDENTIFICATION MOLECULAIRE PAR SPOLIGOTYPAGE, PHYLOSNP ET PCR-RD MULTIPLEX

6.1 Introduction

Le typage moléculaire des mycobactéries (CMT) est un élément important pour le contrôle de la tuberculose. Le spoligotypage fait partie des techniques les plus utilisées pour le génotypage ainsi pour étudier la phylogéographie des souches CMT. En plus de cette méthode, d'autres marqueurs génomiques tels que la région de différence (RD) et le polymorphisme mono-nucléotidique (SNP) sont utilisés pour étudier la phylogénie des mycobactéries.

En Algérie, les données sur les génotypes impliqués dans l'infection tuberculeuse sont en grande partie inconnues, en raison du manque des ressources de la majorité des laboratoires pour identification moléculaire des mycobactéries responsables de la tuberculose. Dans ce contexte, nous avons effectué une étude dont les objectifs sont :

- Caractérisation moléculaire des souches responsables de la tuberculose bovine et humaine dans la wilaya de Béjaia et Sétif ;
- Mettre en évidence le caractère zoonotique de la tuberculose bovine en Algérie, ainsi déterminer la proportion de l'infection humaine par *M. bovis*.

6.1.1 Spoligotypage

6.1.1.1 Inactivation des souches par la chaleur (lyse cellulaire)

Pour le génotypage de la totalité des souches (d'origine humaine et bovine), une boucle pleine de colonies a été transféré dans un cryotube (2 ml) et suspendue dans 0,5 ml de l'eau distillée stérile. Par la suite, les souches ont été inactivées par la chaleur à 100 °C pendant 5 min dans un bain maré et conservées à -20 °C

jusqu'à leur analyse moléculaire à l'Institut de Médecine Tropicale, Anvers (Belgique). Le spoligotypage a été réalisé suivant le protocole de Kamerbeek et *al.* [12].

6.1.1.2 Amplification d'ADN par PCR

6.1.1.2.1 Principe

La première étape de spoligotypage consiste à amplifier la région DR d'une souche donnée. Pour l'amplification des Spacers de la séquence DR, nous avons utilisé deux amorces inversées, marquées à la biotine et complémentaires à la séquence DR.

6.1.1.2.2 Matériel

- Blouse
- Gants
- Boite en polystyrène + glace
- Hotte de biosécurité (PMS 2)
- Micro-centrifugeuse (d'Eppendorf)
- Micropipettes (20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Embouts (0,5-10 µl, 0,5-20 µl, 1-200 µl, 1-1000 µl)
- Tubes Eppendorf
- Cryotubes (2 ml)

6.1.1.2.3 Solutions

- DNA-ExitusPlus®
- ETHANOL 70% + IPA 2,1%
- Eau de biologie moléculaire
- Amorce 1 (Dra) : 5' Biotine GGT-TTT-GGG-TCT-GAC-GAC 3'
- Amorce 2 (Drb): 5' CCG-AGA-GGG-GAC-GGA-AAC 3'
- AND Taq polymérase (5 U/ µl)
- Tampon KTT (800 µl) + MgCl₂ (400 µl)
- dNTPS (dATP, dGTP, dCTP et dTTP)

6.1.1.2.4 Protocole

6.1.1.2.4.1 Pré-PCR : Préparation du milieu réactionnel (Mix PCR)

La préparation du Mix PCR doit être effectuée sous une hotte (PMS 2) préalablement décontaminée par DNA-ExitusPlus et ETHANOL + IPA pour éviter toute contamination. Pour chaque préparation, un Mix a été préparé pour 45 réactions et divisé en deux cryotubes de 2 ml (un pour 20 et l'autre pour 25 échantillons) comme est illustré dans le tableau 6.1. Par la suite, le Mix PCR a été centrifugé à 7000 tours/ min pendant 5 à 7 secondes. 46 µl de ce mélange ont été distribués dans un tube Eppendorf.

Tableau 6.1 : Protocole de préparation du Mix PCR du spoligotypage (45 réactions).

Réactifs (46 µl/ Réaction)	Volume pour 45 réactions (µl)	
	20	25
H2O (Pour 4 µl ADN)	308	385
Tampon 2x	500	625
dNTP'S (2,5 mM)	80	100
Amorce 1 (25 pmol/ µl)	16	20
Amorce 2 (25 pmol/ µl)	16	20
ADN Taq polymérase (5 U/ µl)	4	5
46 µl du Mix/ tube Eppendorf		

6.1.1.2.4.2 Amplification

Pour chaque préparation, nous avons préparé 40 tubes Eppendorf dont chacun contient 46 µl du Mix PCR. Ces tubes ont été transférés au laboratoire d'amplification (PCR Lab) dans une boîte qui contient de la glace. À l'aide d'une micropipette (P10) on ajoute 4 µl de la suspension bactérienne inactivée de chaque échantillon par tube. Trois tubes ont été utilisés comme des témoins :

- Témoin négative : contient uniquement de l'eau (50 µl)
- Témoin positif : 46 µl du Mix PCR + 4 µl d'ADN de *M. tuberculosis* (H37Rv)
- Témoin positif : 46 µl du Mix PCR + 4 µl d'ADN de *M. bovis* (ITM 1998-00269).

Après d'addition des souches à tester, les tubes ont été placés dans le thermocycleur pour l'amplification selon le programme suivant :

Tableau 6.2 : Programme d'amplification par PCR du spoligotypage.

Etapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	96°C	3 min
Dénaturation	96°C	1 min
Hybridation	55°C	1 min
Elongation	72°C	30 s
Elongation finale	72°C	5 min
Nombre de cycles	20 cycles	

6.1.1.3 Hybridation des produits amplifiés sur la membrane Biotyne C

6.1.1.3.1 Principe

Les produits de PCR sont hybridés perpendiculairement aux 43 lignées oligo-Spacer d'ADN synthétique de la membrane Biotyne C activée. Après l'hybridation, la membrane est incubée dans la streptavidine peroxydase, qui se lie au marqueur biotine sur les produits de PCR. La présence de Spacer est visualisée sur le film après incubation avec des réactifs de détection à chimiluminescence améliorée (ECL).

6.1.1.3.2 Matériel

- Blouse
- Gants
- Glace
- Boîte en polystyrène
- Cryotubes coniques (2 ml)
- Micropipettes (200 µl)
- Embouts (1-200 µl)
- Plaque chauffante
- Pincettes en plastique
- Bain marée
- Incubateur d'hybridation
- Agitateur
- Récipient en polystyrène
- Papier film transparent
- Flacons en verre (100 ml, 250 ml, 500 ml)
- Miniblotter
- Membrane Biotyne C activée
- Cassette

- Flacon en plastique 50 ml
- Chronomètre
- Flacon gradué (1L)
- Film photographique
- Flacons en verre d'hybridation

6.1.1.3.3 Solutions

- 2xSSPE-SDS 0,1%
- 2xSSPE-SDS 0,5%
- 2xSSPE
- SDS 1%
- EDTA 20 Mm
- Streptavidine peroxydase
- Révélateur
- Eau distillée
- Fixateur
- Réactif de détection ECL 1 (Luminol Enhancer solution) et 2 (Peroxide solution)

6.1.1.3.4 Protocole

6.1.1.3.4.1 Préparation des tampons

Tous les tampons doivent être fraîchement préparés à partir des solutions mères, en utilisant l'eau distillée (Cf. Appendice E). Les quantités nécessaires des tampons pour une membrane sont :

- 250 ml 2xSSPE- SDS 0,1% (60 °C, ± 1 °C)
- 500 ml 2xSSPE- SDS 0,5% (60 °C, ± 1 °C)
- 500 ml 2xSSPE- SDS 0,5% (42 °C, ± 1 °C)
- 250 ml 2xSSPE- SDS 0,1% (Température ambiante (TA))
- 500 ml 2xSSPE (TA)

1. Pour chaque échantillon, 20 µl du produit amplifié ont été dilués dans 150 µl du tampon 2xSSPE- SDS 0,1% (TA).
2. Dénaturer par la chaleur (à 99 °C, ± 1 °C) le produit de PCR dilué durant 10 min, puis refroidir immédiatement par la glace.
3. Laver de la membrane par 250 ml 2xSSPE- SDS 0,1% à 60 °C (± 1 °C) durant 5 min.

4. Ouvrir le miniblottter, placer un support (en polystyrène) puis la membrane de telle manière que les fentes de miniblottter soient perpendiculaires aux lignes des oligonucléotides (membrane), puis bien fermer le miniblottter avec les vices.
5. Retirer le tampon résiduel dans les fentes de miniblottter par aspiration.
6. Remplir les fentes 1-3 et 44-45 avec 2xSSPE- SDS 0,1% (TA), et le reste des fentes avec 150 µl du produit amplifié dilué et dénaturé, tout en évitant les bulles d'air, puis hybrider pendant 60 min à 60 °C sur une surface horizontale dans le bain marée sans agitation afin d'éviter la contamination des fentes voisines.

NB : les fentes 4, 5 et 6 sont réservées aux témoins positifs *M. tuberculosis*, *M. bovis* et au témoin négatif respectivement.

7. Retirer le produit de PCR par aspiration, et prendre la membrane à l'aide d'une pince en plastique et la mettre dans un récipient en plastique.
8. Laver la membrane deux fois dans 250 ml de 2xSSPE- SDS 0,5% (60 °C, ± 1 °C) sous agitation pendant 10 min à 60 °C (± 1 °C)
9. Ajouter 5 µl de Streptavidine-peroxidase au 20 ml de 2xSSPE- SDS 0,5% préchauffé à 42 °C et incuber la membrane dans cette solution dans tube à hybridation sous agitation dans incubateur d'hybridation pendant 60 min à 42 °C (± 1 °C)
10. Laver la membrane deux fois dans 100 ml de 2xSSPE- SDS 0,5% préchauffé à 42 °C pendant 10 min à 42 °C (± 1 °C)
11. Rincer la membrane deux fois avec 250 ml de 2xSSPE (TA) sous agitation à l'aide de l'agitateur pendant 5 min à température ambiante.
12. Pour la détection chimiluminescente de l'ADN hybridé, mettre la membrane pendant 5 min dans 20 ml de liquides de détection ECL (10 ml ECL1 et 10 ml ECL2).
13. Couvrir la membrane avec un papier film transparent, puis l'exposer contre un film photographique dans une cassette dans une pièce sombre pendant 30 minutes. La dégradation du luminol par la peroxydase libère une énergie lumineuse (photons) qui imprime le film photographique.

14. Développer le film photographique dans une pièce sombre, retirer le film photographique de la cassette et le mettre dans un bain de solution révélatrice (1 min), puis dans un bain de solution fixatrice (1 min)

15. Rincer le film dans un bain d'eau distillée, puis avec de l'eau de robinet et laisser pour qu'il sèche.

6.1.1.3.5 Réutilisation de la membrane

La membrane Biodyne C peut être utilisée 15 fois, et après chaque utilisation doit être lavée pour éliminer le produit PCR avec une solution SDS 1% préchauffée à 80 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) dans un bain marée sous agitation pendant 30 min (deux fois), puis avec une solution EDTA 20 mM pendant 15 min à température ambiante sous agitation (agitateur) et enfin couvrir avec un papier film transparent (pour éviter la déshydratation) et la conserver à 2-8 °C.

6.1.1.4 Lecture et analyse des résultats

L'hybridation des Spacers amplifiés apparaît sous forme d'un carré noir (Cf. figure 6.1). Les profils génomiques (spoligotypes) ainsi obtenus ont été traduits sous forme d'un code binaire (1 : présence d'hybridation, 0 : absence d'hybridation) et saisis dans un fichier Excell. L'analyse de ces données et la construction du dendrogramme ont été réalisées en utilisant la base des données internationale MIRU-VNTR_{plus} (<http://www.miru-vntrplus.org>), tandis que la désignation des noms internationaux pour les profils de spoligotypes d'origine bovine a été obtenue à partir de base des données de spoligotypes *Mycobacterium bovis* (<http://www.M.bovis.org/>). Un cluster a été défini comme deux isolats ou plus provenant de différents hôtes avec des profils de spoligotype identiques. Isolats orphelins ont été définis comme un profil de spoligotype non décrit dans la base de données internationales MIRU-VNTR_{plus} ou *Mycobacterium bovis*.

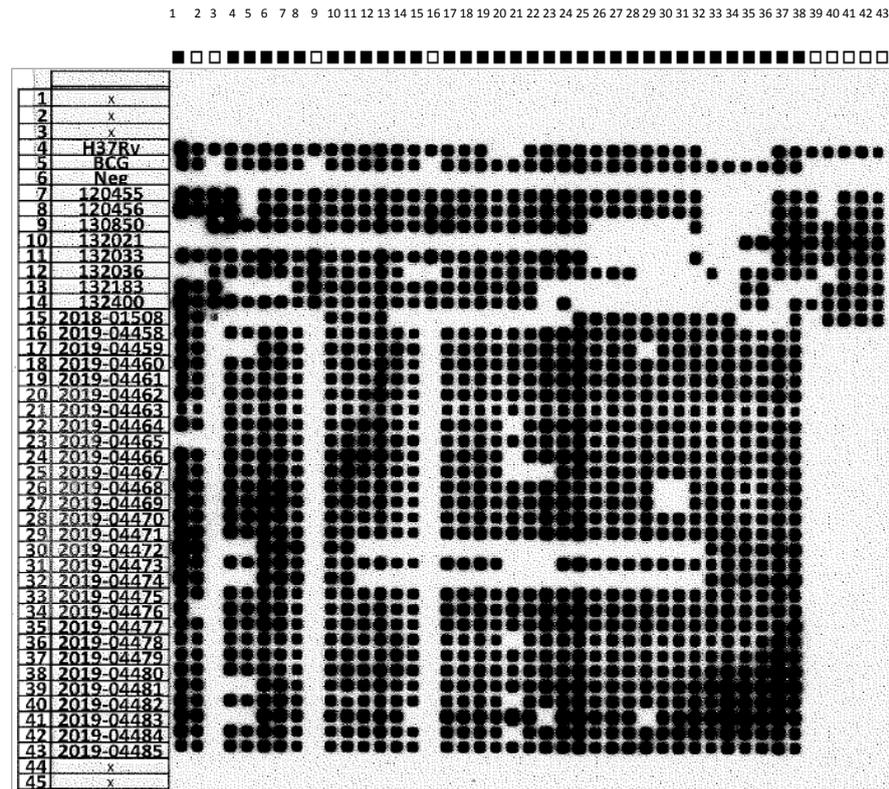


Figure 6.1 : Profils génomiques obtenus par spoligotypage des témoins positifs (lignes 4 -5) et témoin négatif (ligne 6) et 37 souches cliniques d'origine humaine et bovine (lignes 7-43). Chaque colonne correspond un Spacer (1-43) (Photo personnelle, 2019).

Les souches qui n'étaient pas étroitement regroupées avec les spoligotypes typiques du CMT (08 souches d'origine humaine et 05 souches d'origine bovine), ont été analysées par la technique PhyloSNP et PCR-RD Multiplex :

6.1.2 PhyloSNP

L'analyse PhyloSNP est basée sur l'identification de SNP spécifiques à la lignée. Nous avons utilisé des paramètres optimisés légèrement différents de ceux utilisés par Cancino-Muñoz [444]. Le test consistait en deux PCR, l'un ciblant les SNP spécifiques pour les lignées 1, 2 et 5 (L1 – L2 – L5) et l'autre pour L3 – L4 – L6, suivis d'un séquençage de Sanger. La révélation des fragments se fait par électrophorèse. Les séquences ont été alignées sur la souche de référence H37Rv *M. tuberculosis* en utilisant CLC séquence viewer® 8 et SnapGene viewer® 4.2.9 (pour la visualisation) pour identifier les SNP spécifiques de la lignée ainsi que les doubles pics indiquant des infections mixtes.

Le Mix PCR ainsi le programme d'amplification de la méthode PhyloSNP sont illustrés dans le tableau 6.3 et 6.4.

Tableau 6.3 : Protocole de préparation du Mix PCR du PhyloSNP.

Réactifs	PCR L125	PCR L346
	Pour 20 réactions (µl)	Pour 20 réactions
Tampon Q	180	Remplacer tampon Q par eau
Tampon 2x	500	
dNTP (2,5 mM)	80	
Amorce 1 (L125) (25pmol/ µl)	20	L346 Amorce 1
Amorce 2 (L125) (25pmol/ µl)	20	L346 Amorce 2
AND Taq polymerase 5U/µl	4	
Distribuer 40 µL /tube		
Ajouter 10 µL d'ADN / tube		

Les séquences d'amorces 1 et 2 sont illustrées dans l'appendice F.

Tableau 6.4 : Programme d'amplification par PCR de PhyloSNP (PCR L125 et L346).

Etapes	Temperature	Temps
Dénaturation initiale	95°C	3 min
Dénaturation	95°C	30 s
Hybridation	67,4°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Elongation finale	72°C	10 min
Nombres de cycles	45	

6.1.3 PCR-RD Multiplex

Nous avons appliqué la méthode de PCR multiplex en deux étapes basées sur les RD génomiques (RD1, RD1^{mic}, RD2^{seal}, RD4, RD9 et RD12) pour la différenciation de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* (BCG), *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* et *M. canettii* tels que décrits par Warren et al. [445].

Le protocole de préparation du Mix ainsi le programme d'amplification du PCR-RD appliqués sont comme suit :

Tableau 6.5 : Protocole de préparation du Mix PCR-RD Multiplex.

Réactifs	Volume pour chaque réaction (µl)
H ₂ O	25
Tampon Q	5
Tampon 10 x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP'S (10 mM)	2
Amorce 1 (50 pmol/ µl)	0,5
Amorce 2 (50 pmol/ µl)	0,5
ADN Taq polymérase (5 U/ µl)	0,125
1 µl ADN	

Amorce 1 inclut : RD1, RD4, RD9 et RD 12 ; **Amorce 2** inclut : RD1^{mic} et RD2^{Seal}. Les séquences de ces amorces sont illustrées dans l'appendice G.

Tableau 6.6 : Programme d'amplification par PCR Multiplex.

Etapes	Temperature	Temps
Dénaturation initiale	95°C	15 min
Dénaturation	94°C	1 min
Hybridation	62 °C	1 min
Elongation	72°C	1 min
Elongation finale	72°C	10 min
Nombres de cycles	45	

6.2 Résultats

Le spoligotypage de 296 souches isolées chez l'homme (n= 115) et les bovins (n= 181) a révélé que toutes les souches appartiennent au CMT, dont 181 *M. bovis*, 107 *M. tuberculosis*, 04 "*M. pinnipedii-like*" (proche du profil *M. pinnipedii*), 03 *M. caprae* et 01 "*M. microti-like*" (proche du profil *M. microti*) (Cf. figure 6.2 et appendice H).

A total, 97 spoligotypes différents ont été identifiés, soit une diversité globale de 32,8% (97/296) (Cf. figure 6.2). Environ, 79,4% (235/296) des isolats sont

regroupés en 36 clusters contenant de 2 à 61 isolats, tandis que les 61 (20,6%) isolats restants sont uniques (Cf. appendice H).

Dans l'ensemble, 264 souches (89,2%) ont pu être attribués à 72 différents types internationaux partagés (SIT) ou à *M. bovis* spoligotypes (SB) publiés, tandis que 24 souches (8,1%) (23 *M. tuberculosis* et 01 "*M. pinnipedii-like*" d'origine humaine) n'avaient aucun profil homologue dans la base des données (sans SIT/SB) et ils sont considérés comme « orphelines » et huit souches *M. bovis* ont été attribuées à sept nouveaux profils SB (SB2695 à SB2701) (Cf. appendice H).

Sur 181 souches bovines, 174 ont été identifiées comme *M. bovis*, 03 *M. caprae*, 03 "*M. pinnipedii-like*" et 01 "*M. microti-like*". Au total, 42 spoligotypes ont été obtenus, avec 155/181 (85,6%) des isolats regroupés en 16 clusters contenant de 2 à 57 isolats (Cf. appendice H).

Vingt-huit des spoligotypes d'origine bovine, représentant 23,7% (43/181) de nos isolats bovins, n'étaient pas précédemment signalés en Algérie. À l'exception de cinq spoligotypes existants et des sept nouveaux spoligotypes, tous les types de SB ont été déjà signalés dans les pays limitrophes d'Afrique du Nord ou d'Europe du Sud. La plupart des isolats appartenant aux spoligotypes précédemment rapportés en Algérie faisaient partie d'un cluster dans cette étude. La fréquence la plus élevée a été enregistrée pour SB0120 (n = 57, 31,5%) suivi de SB0121 (n = 41, 22,6%) et SB0134 (n = 18, 9,9%). Les trois souches de *M. caprae* appartiennent aux spoligotypes SB0835 (deux isolats) et SB1451 (Cf. tableau 6.7).

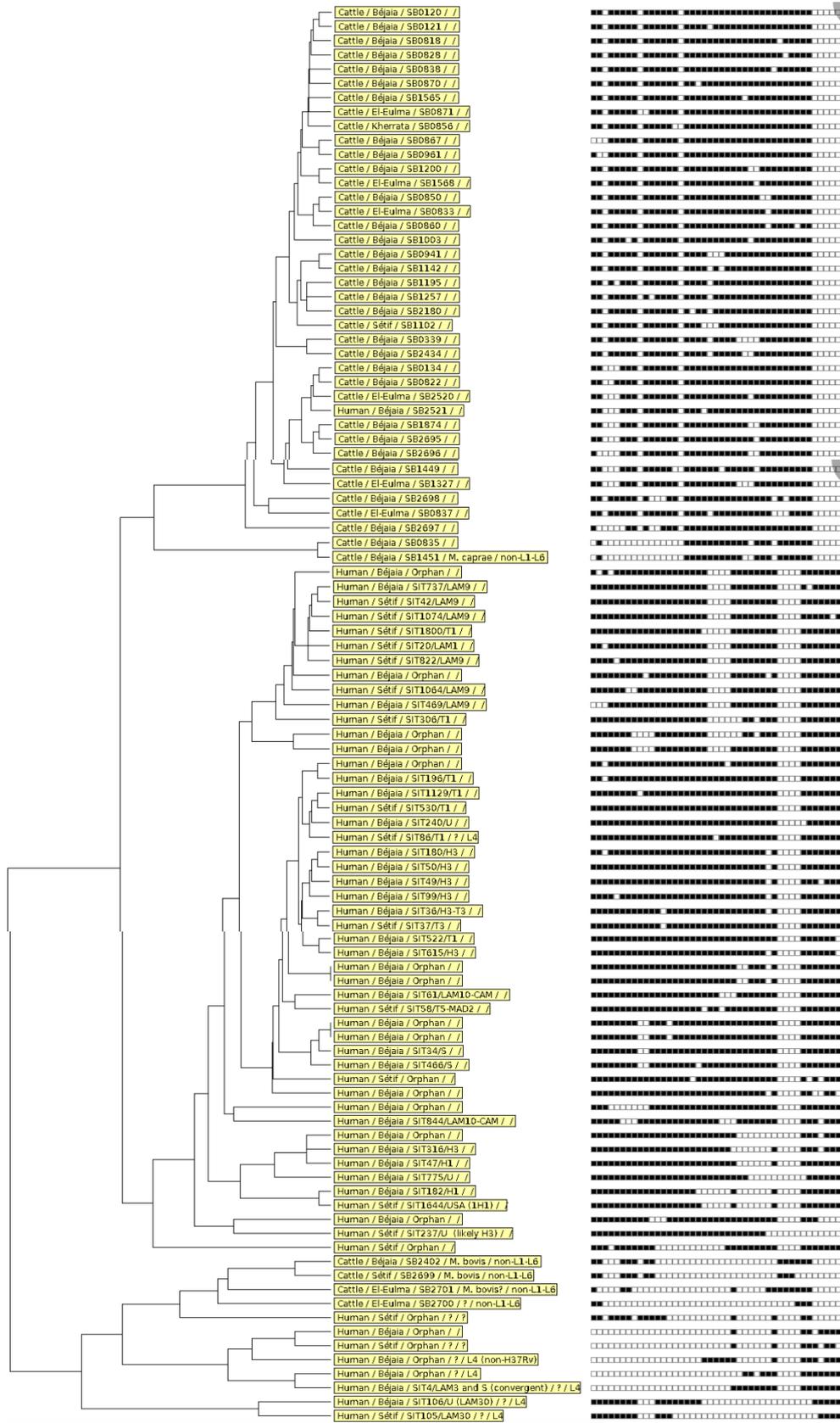


Figure 6.2 : Arbre phylogénétique des 97 spoligotypes des 296 souches d'origine humaine et bovine (Photo personnelle, 2020).

* Spoligotypes enregistrés dans la base des données “*M. bovis*”. ‡ Spoligotypes identifiées à partir des isolats d’origine humaine et bovine dans la présente étude ; † Spoligotype identifié à partir d’un seul isolat humain ; Spoligotypes marqués en gras ne sont pas identifiés dans les pays limitrophes ou les pays du Sud d’Europe ; Spoligotypes soulignés appartiennent aux clusters dans la présente étude.

Parmi 115 souches humaines, 107 ont été identifiées comme *M. tuberculosis*, 07 *M. bovis* et 01 “*M. pinnipedii-like*”. Au total 55 spoligotypes ont été obtenus, avec 80/115 (69,6%) d’isolats regroupés en 20 clusters, contenant de 2 à 14 isolats (Cf. appendice H). Les souches *M. tuberculosis* ont été classées en six familles (clades) dont la Méditerranée latino-américaine (LAM, n = 31, 29%), T (n = 23, 21,5%), Haarlem (H, n = 21, 19,6%), Ural (U, n = 6, 5,6%), S (n = 2, 1,9%) et USA (n = 1, 0,9%) (Cf. tableau 6.8 et figure 6.3). La comparaison de la distribution des clades dans les deux wilayas montre que la fréquence de Haarlem (25%, 21/84) et S clade (2,4%, 2/84) était élevée dans la wilaya de Béjaïa, tandis que T (43,5%, 10/23), Ural (8,7%, 2/23) et S clade (4,3%, 1/23) ont été prévalents dans la wilaya de Sétif (Cf. tableau 6.8).

Tableau 6.8 : Distribution des clades *M. tuberculosis* identifiés dans les deux wilayas.

Clade	Béjaïa	Sétif	Total
	Nbr. (%)	Nbr. (%)	Nbr. (%)
LAM	24 (28,6)	7 (30,4)	31 (29)
Tuscany (T)	13 (15,5)	10 (43,5)	23 (21,5)
Haarlem (H)	21 (25)	0	21 (19,6)
Ural (U)	04 (4,8)	02 (8,7)	06 (5,6)
S	02 (2,4)	0	02 (1,9)
USA	0	01 (4,3)	01 (0,9)

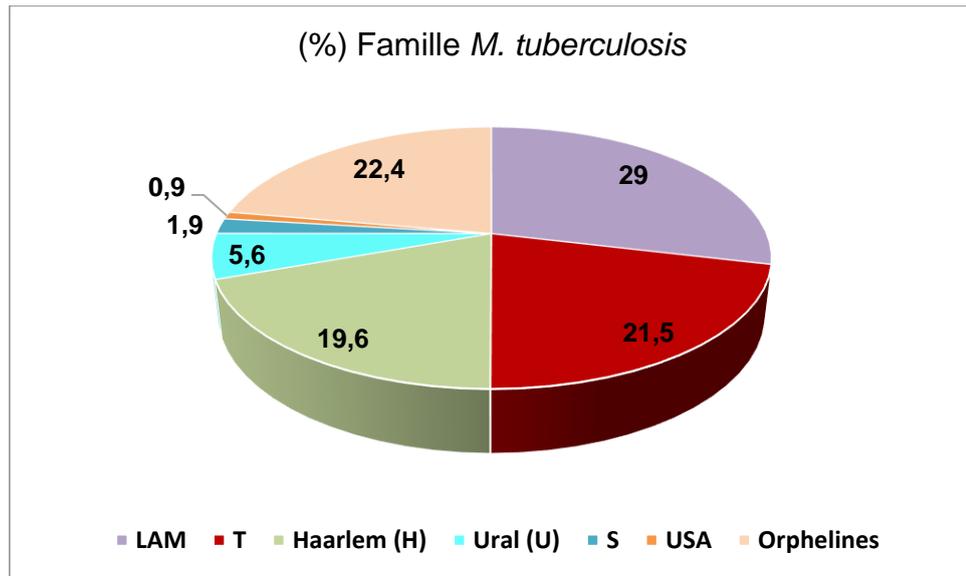


Figure 6.3 : Répartition de six familles identifiées par spoligotypage à partir des souches *M. tuberculosis* isolées chez l'homme.

Les profils de spoligotypes les plus répandus étaient LAM 9/ SIT 42 (n = 14, 13,1%), T1/SIT 53 (n = 8, 7,5%) et T1/SIT 1800 et H3/SIT 50, chacun avec six isolats (5,6 %) (Cf. figure 6.4).

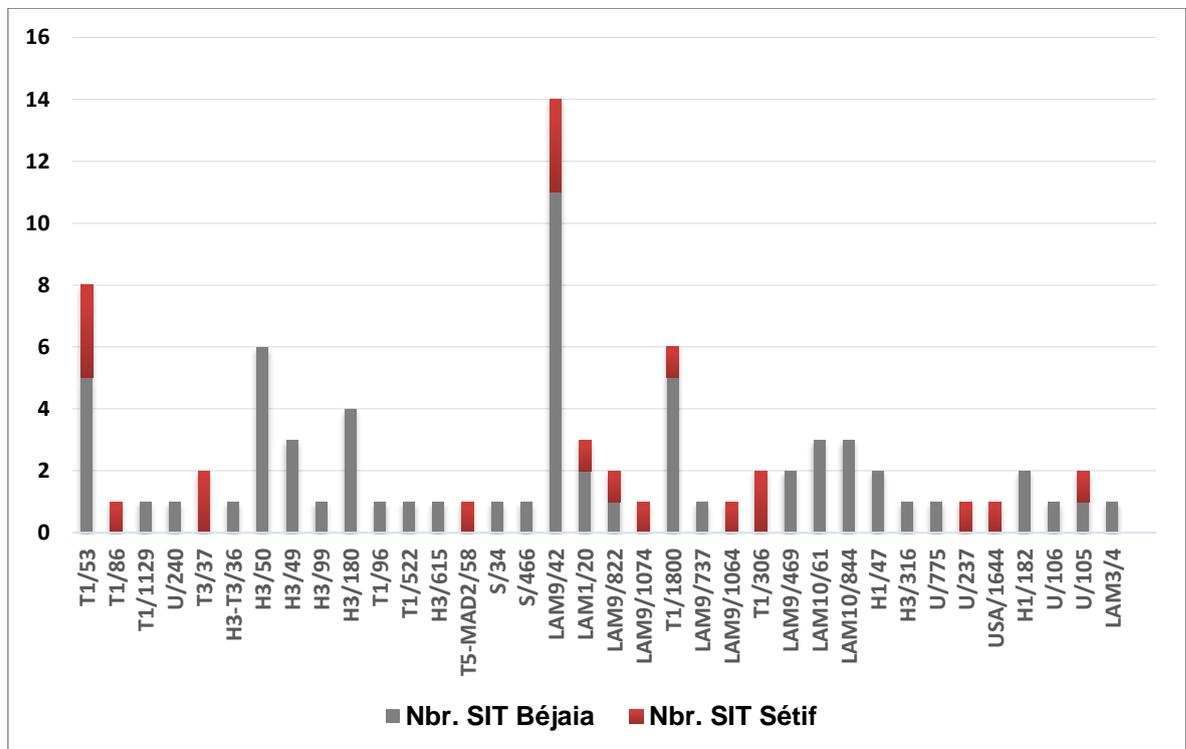


Figure 6.4 : Distribution des spoligotypes (SIT) des souches *M. tuberculosis* isolées chez l'homme dans la wilaya de Béjaia et Sétif.

Concernant les souches *M. bovis*, quatre spoligotypes différents ont été identifiés, dont six isolats ont été regroupés avec ceux isolés chez le bovin (SB0120, SB0121 et SB0860), tandis qu'un isolat (SB2521) ne correspond à aucun de nos isolats bovins (Cf. appendice H). La proportion d'isolement de *M. bovis* chez des patients atteints de tuberculose extra-pulmonaire (2/32, 6,2%) ne différait pas de celle des patients atteints de tuberculose pulmonaire (5/83, 6%) ($p = 0,9638$; tableau 6.9 et figure 6.5). *M. bovis* représentait 14,3% (4/28) des isolats humains du CMT de Sétif et 3,4% (3/87) des isolats humains de Béjaia ($p = 0,0536$; tableau 6.9 et figure 6.5).

Tableau 6.9 : Distribution du CMT isolés chez l'homme selon la forme de tuberculose dans la wilaya de Béjaia et Sétif.

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	Odds ratio ; p
Pulmonaire	78	5	OR 10,40 (95% CI 0,19-5,65) ; $p = 0,9638$
Extra-pulmonaire	30	2	
Sétif	24	4	OR 46,67 (95% CI 0,98-22,30) ; $p = 0,0536$
Béjaia	84	3	

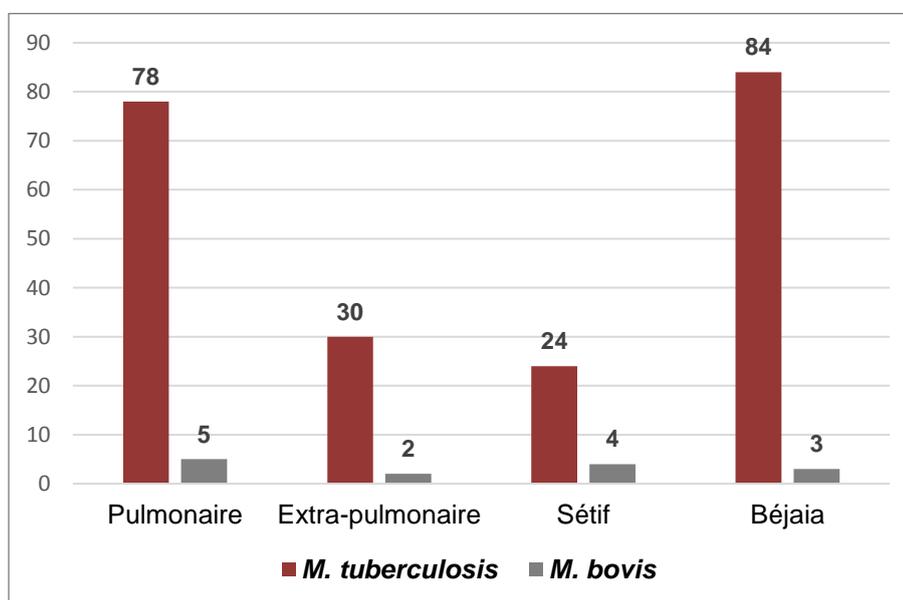


Figure 6.5 : Distribution du CMT isolés chez l'homme selon la forme de tuberculose dans la wilaya de Béjaia et Sétif.

6.3 Discussion

Sur la base du spoligotypage, tous les 181 isolats d'origine bovine appartiennent au CMT, dont *M. bovis*, *M. caprae*, *M. "microti-like"* and *M. "pinnipedii-like"*. Ces espèces sont connues par leur potentiel zoonotique. Il est intéressant de noter que l'infection par des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) n'a été trouvée dans aucun cas de tuberculose bovine. Les mêmes résultats ont été rapportés au Maroc [176]. En revanche, l'implication des MNT dans l'infection tuberculeuse bovine a été signalée en Algérie (3%) [5] et dans du nombreux pays limitrophes comme la Tunisie (3%), le Mali (10,1%) et le Niger (38,5%) [175] ;[177] ; [446].

Trois profils de spoligotypes ont été les plus fréquemment identifiés dans notre étude (SB0120, SB0121 et SB0134) et ils sont les plus répandus dans le monde. SB0120 et SB0121 sont les profils prédominants de *M. bovis* circulant chez les animaux, y compris les bovins [451], en particulier en Afrique (Algérie, Tunisie et Maroc etc.) [5];[176] ;[446] et dans les pays européens (France, Espagne, Italie, Portugal et Belgique) [123] ;[450] ;[452]. Le spoligotype SB0134 a été fréquemment identifié en Algérie (7%) et dans les pays limitrophes comme la Tunisie (11,4%) et le Mali (15%) [5] ; [174] ; [446] ainsi répandu en France et en Espagne [450] ;[452]. L'importation de bovins laitiers d'Europe vers l'Afrique du Nord, y compris l'Algérie, pratique encore courante à ce jour, pourrait expliquer la diffusion de ces profils. Cette hypothèse est confortée par le lien phylogénétique entre les isolats de *M. bovis* d'Algérie et de France [5].

Sur la base d'une analyse de la séquence du génome entier dans une étude récente comprenant des isolats de diverses origines géographiques, Les spoligotypes SB0120, SB0134, SB0828 et SB1003 appartenaient au clade unknown2 et les spoligotypes SB0120, SB0833, SB0860, SB0870 et SB0871 appartenaient au clade unknown4. Les souches de *M. bovis* appartenant à ces clades sont répandues en Afrique du Nord et de l'Est ainsi qu'en Europe du Sud, ce qui reflète la présence des échanges de souches entre l'Afrique et l'Europe du Sud [453].

Concernant *M. caprae*, deux spoligotypes ont été identifiés (SB0835 et SB1451). Cette espèce a été isolée précédemment en Algérie et dans d'autres pays

africains [5] ; [176] ;[439] ; [446] ;[454]. En Afrique, y compris l'Algérie, les bovins sont élevés en cohabitation avec les caprins et les ovins, qui servent à des réservoirs des mycobactéries [5] ;[455]. En réalité, le partage des points d'abreuvement et de pâturage entre les caprins et les bovins, permettant une interaction étroite entre ces animaux domestiques et augmentant ainsi la probabilité de transmission inter-espèces de mycobactéries [456].

Étonnamment, nous avons identifié un nouveau profil comme *M. microtii* et quatre profils comme *M. pinnipedii*. Il s'agit de la première étude qui montre la présence de ces espèces parmi les échantillons bovines et humaines en Algérie. *M. microti* a été décrit comme la cause de la tuberculose chez les rongeurs sauvages [457] ;[458] mais il peut également infecter d'autres animaux, dont les bovins [459] ; [182]. La transmission zoonotique pourrait se produire directement des rongeurs à l'homme ou par intermédiaire des animaux domestiques à savoir les chats, les chiens ou les bovins [82] ; [458]. *M. pinnipedii* provoque la tuberculose chez certains nombres d'espèces de pinnipèdes, et une transmission à l'homme et aux bovins a été signalée. Les pinnipèdes infectés par *M. pinnipedii* dans les zoos et les parcs marins sont la principale source d'infection pour les autres animaux et l'homme [460]. Dans notre étude, la source de l'infection des bovins par ces deux espèces atypiques du CMT reste inconnue. Par conséquent, une analyse génétique supplémentaire (séquençage du génome entier) est nécessaire pour caractériser davantage ces souches, car le spoligotypage a une capacité discriminatoire limitée et les divergences phylogénétiques ne peuvent pas être déterminées de manière fiable [461] et la PCR-RD appliquée dans cette étude ne cible qu'un nombre limité de RD [445] ;[453].

Chez l'homme, tous les isolats ont été inclus dans les espèces CMT, 93% (107/115) des cas de tuberculose sont causés par *M. tuberculosis*, 6% (07/115) par *M. bovis* et 1% par "*M. pinnipedii-like*". Près de 99% des cas de la tuberculose humaine en Afrique sont causés par des espèces CMT, dont 92% par *M. tuberculosis* [462].

Concernant l'infection de l'homme par *M. bovis* est souvent signalée dans les pays en développement, en particulier en Afrique [199]; [202] ; [463-465]. La présente étude a mis en évidence pour la première fois l'implication du *M. bovis*

dans l'infection humaine en Algérie. La plupart des isolats *M. bovis* ont été identifiés à partir d'échantillons pulmonaires, reflétant une infection par voie aérienne. Cette forme de tuberculose zoonotique survient généralement chez les personnes qui ont des contacts fréquents avec des bovins infectés, comme les éleveurs et les vétérinaires [262]. Cependant, de nombreux auteurs suggèrent l'association entre tuberculose zoonotique et infection extra-pulmonaire avec prédominance d'atteinte ganglionnaire [7] ; [202] ; [466]. Dans la présente enquête, les patients atteints de lymphadénite tuberculeuse n'ont pas été inclus car le diagnostic de cette forme n'est effectué que par l'examen histopathologique des biopsies ganglionnaires. Ceci constitue donc un biais pour l'estimation de la proportion réelle de l'infection humaine par *M. bovis*. Une autre cause de la sous-estimation de cette proportion dans notre étude peut avoir été le fait que les échantillons humains n'ont été cultivés que sur du milieu L-J, qui contient du glycérol, ce qui inhibe partiellement la croissance de *M. bovis* [467].

Le spoligotypage des souches *M. bovis* isolées chez l'homme montre que la majorité des spoligotypes ont été identifiés également chez les bovins dans cette étude. Cette similitude suggère une transmission zoonotique de la tuberculose bovine. En outre, pour documenter les véritables chaînes de transmission, une analyse génétique et épidémiologique plus approfondie sur une période plus longue serait nécessaire. De plus dans cette étude, nous n'avons pas eu accès aux données sociodémographiques des patients (par exemple, la profession, les habitudes alimentaires et le statut VIH) pour évaluer l'influence de ces facteurs sur l'infection humaine, en particulier sur les formes de tuberculose zoonotique.

Nos résultats montrent que les 107 souches de *M. tuberculosis* appartenaient à la lignée 4. Elle fait partie des lignées les plus répandues et les plus virulentes au niveau mondial [468]. Les clades les plus prédominants étaient les clades LAM (29%), T (21,5%) et Haarlem (19,6%) qui ont été également signalés en Algérie et dans les pays d'Afrique du Nord comme les clades les plus répandus [462].

Le premier spoligotype répandu appartient à la sous-lignée LAM 9 (SIT 42, 13,1%). Cette sous-lignée est prédominante en Afrique du Nord ainsi que dans de nombreux pays européens comme l'Espagne, l'Italie et la Belgique, qui partagent

un cluster étroit avec les pays d'Afrique du Nord [469]. Le SIT 42 a été précédemment signalé en Algérie (19,3%) [15], en Tunisie (17%) [470] et au Maroc (24%) [469].

Le deuxième spoligotype répandu appartenait à la sous-lignée T1 (SIT 53, 7,5% et SIT 1800, 5,6%). La sous-lignée T 1 est répandue dans 70% des pays d'Afrique ainsi que dans les pays européens (France, Italie et Belgique) [469]. Cette sous-lignée a une résistance élevée aux antituberculeux par rapport aux autres génotypes [472]. SIT 53 a été signalé précédemment en Algérie (25,3%) [15] et dans d'autres pays d'Afrique comme le Maroc (11,1%) [471] et la Tunisie (10,5%) [470]. Tandis que, SIT 1800 est signalé pour la première fois en Algérie.

Le dernier spoligotype prévalent est H3/SIT 50 avec une fréquence de 5,6%. Ce spoligotype est prédominant en Afrique, y compris en Algérie (19,3%) [15] en Tunisie (29,1%) [470] et au Maroc (5,3%) [471]. Il a été impliqué dans des épidémies de multirésistance aux antituberculeux en Tunisie [470] ; [473].

6.4 Conclusion

Identification moléculaire a révélé une grande diversité d'espèces et génotypes des mycobactéries isolés chez l'homme et les bovins dans deux provinces de l'Algérie.

Nos résultats montrent que tous les isolats appartiennent au CMT et les infections par *M. bovis* et *M. tuberculosis* étaient prévalentes chez les bovins et l'homme respectivement. Cependant, d'autres espèces mycobactériennes telles que *M. microti* et *M. pinnipedii* peuvent être impliqué dans l'infection humaine et bovine. Chez l'homme, 6% des cas ont été causés par *M. bovis*, suggérant une transmission zoonotique de la tuberculose bovine.

Analyse phylogénétique a montré que la majorité des spoligotypes ont été précédemment identifiés dans les pays limitrophes et pays du Sud de l'Europe, ce qui reflète une transmission des souches entre ces pays.

CONCLUSION GENERALE

L'inspection *post-mortem* a révélé une forte prévalence des lésions suspectes de la TB bovine dans les deux wilayas. Nos résultats ont confirmé que tous les cas de tuberculose bovine sont causés par des mycobactéries appartenant au CMT et qui peuvent se transmettre à l'homme. L'isolement de ces agents zoonotiques à partir des viandes destinées à la consommation humaine a mis en évidence le risque de la transmission zoonotique chez l'homme.

Notre étude a décrit pour la première fois en Algérie, la transmission de la TB zoonotique à l'homme due à *M. bovis*, avec une proportion non négligeable (6%). Ce constat devrait attirer l'attention des autorités sanitaires algériennes sur l'importance de l'amélioration des moyens d'identification des mycobactéries responsables de la tuberculose humaine, afin d'évaluer le risque de tuberculose zoonotique chez l'homme. Une collaboration entre les services de santé humaine et les services de santé animale est nécessaire pour instituer et appliquer des mesures sanitaires strictes contre la transmission cette maladie, grâce à la lutte contre la tuberculose bovine, la pasteurisation du lait, une inspection sanitaire détaillée et rigoureuse des viandes et la sensibilisation du grand public sur le risque zoonotique de tuberculose bovine.

La prédominance des sous-lignées (H3/50 et T1/53) hautement résistantes aux antituberculeux en Algérie, nécessite un contrôle plus large de l'émergence et /réémergence des souches multirésistantes dans le pays.

Pour conclure, le spoligotypage a montré une grande diversité des mycobactéries responsables de la tuberculose humaine et bovine dans la région Centre de l'Algérie. Cependant, il est nécessaire d'employer d'autres techniques de typage telles que MIRU-VNTR et le séquençage du génome entier pour une meilleure évaluation du risque de transmission de tuberculose bovine à l'homme et pour l'identification des sources et voies de transmission de l'infection chez les deux hôtes. De plus, des études plus larges avec un échantillonnage combinant l'homme et les bovins dans d'autres régions du pays est recommandée pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie au niveau national.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

L'application des recommandations de l'OMS, l'OIE et Union internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires concernant la tuberculose humaine et bovine devrait constituer l'ultime feuille de route dans la lutte ainsi que la prévention de la tuberculose. Sur la base de ces recommandations et les résultats obtenus par notre étude, nous proposons quelques recommandations et perspectives afin d'améliorer les connaissances et moyens de contrôle de la tuberculose humaine et bovine en Algérie :

- Mise en place un système d'identification de tout le cheptel bovin, qui permet de retracer efficacement les troupeaux d'origine des animaux tuberculeux, avec l'application régulière de l'IDR, suivie de l'élimination des cas positifs.
- Inspection rigoureuse des viandes dans les abattoirs afin de retirer les produits contaminés de la chaîne alimentaire ;
- Campagnes de sensibilisation des éleveurs, le personnel de l'abattoir et du grand public sur les dangers de la tuberculose bovine ;
- Amélioration des pratiques d'hygiène grâce à la pasteurisation du lait et les produits laitiers en particulier dans les régions rurales ;
- Une collaboration entre les services vétérinaires et les services de santé humaine est indispensable afin de lutter et prévenir la tuberculose zoonotique ;
- Amélioration des moyens du diagnostic de la tuberculose humaine grâce à l'utilisation des outils moléculaires afin d'identifier et caractériser la tuberculose zoonotique ;
- Des études épidémiologiques sur la tuberculose chez d'autres espèces animales (petits ruminants, dromadaires, etc.) seraient souhaitables ;
- Des enquêtes épidémiologiques et moléculaires sur la tuberculose humaine et bovine dans différentes régions du pays sont recommandées ;
- Des enquêtes sur l'émergence des souches résistantes aux antituberculeux doivent être envisagées.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

AND : Acide Désoxyribonucléique
ADNr : ADN ribosomale
ARN : Acide Ribonucléique
ARR : Acido-Alcool-Résistance
BAAR : Bacilles Acido-Alcool-Résistances
BCG : Bacille Calmette et Guérin
BK : Bacille de Koch
CFP-10 : Culture Filtrate Protein
CFU : Unité formant colonie
CM : Common Mycobacteria
CMT: Complexe *Mycobacterium tuberculosis*
DR: Direct Repeats
ECL : Enhanced Chemi-Luminescence
EDTA: Acide éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent assay
EMB: Ethambutol
ESAT-6: Early Secretory Antigenic Target 6
fg : Femtogramme
HE : Hemalun- éosine
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
IDC: Intradermo-tuberculation comparative
IDR : Intradermoréaction
IDS : Intradermo-tuberculation simple
IFN- γ : Interféron gamma
IL : Interleukine
INH : Isoniazide
IS : Séquence d'insertion
KDa: Kilodalton
LAM: Lipoarabino-mannanes

LJ: Lowenstein-Jensen
MAC : *Mycobacterium avium intracellulaire*
MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
MGIT: Milieu *Mycobacteria growth indicator tube*
MNT : Mycobactéries non tuberculeuses
NASBA: Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
NL : Nœud lymphatique
OIE : Organisation Internationales de la Santé Animale
OMS : Organisation Internationale de Santé
PCR : Polymérase Chain Réaction
PE : Proline-glutamic acid
Pmol : 10^{15} moles
PNB : Acide Para Nitro-Benzoïque
PPD : dérivé de protéines purifiées
PPE : Proline-proline-glutamic acid
PZA : Pyrazinamide
RFLP : Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction
RIF : Rifampicine
SDS : Dodécyl sulfate de Sodium
SCTMR : Service de Control de la Tuberculose et les Maladies Respiratoires
SM : Streptomycine
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SSPE: Tampon chlorure de Sodium, Phosphate de Sodium
TCH : Hydrazide de l'acide Thiophène 2 Carboxylique
TDM : Tréhalose dimycolate
TMM : Tréhalose mono-mycolate
TNF: Tumor Necrosis factor
VIH: Virus immune-deficiency Human
VNTR: Variable Number Tandem Repeats
WGS: Whole Genome Sequencing
ZN : Ziehl-Neelsen

APPENDICE B

MODE OPERATOIRE DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DÉCONTAMINATION

Méthode	Petroff	Tacquet et Tison	Kent et Kubika	Kudoh	Petroff modifiée	Cétylpyridium 1 % et NaCl 2%	Chlorhexidine	Acide oxalique	LJ
Prélèvement	2 ml	2 ml	2 ml	CT imbibé	3-5 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2ml
Fluidification décontamination	+2 ml NaOH 4 % Agiter 20 min 25 °C	+3 ml Laurylsula-te de sodium Agiter 30 min 25 °C	+2 ml NaCL- NaOH Agiter 20min 25 °C	NaOH / 2 min	+3-5 ml NaOH 4% Agiter 15 min 25 °C Centrifuger 15 min à 3000 tr/ mn Jeter le surnageant	+2 ml Bien mélanger et conserver à température ambiante jusqu'à transport au labo de culture [une semaine]	+2 ml dithiothréitol Agiter 15 min Ajouter 6 ml de chlorhexidine à 1 %. Agiter 15 min	+2 ml COOH 25 % Agiter 20 min 25 °C	+2 ml H ₂ SO ₄ Agiter 20 min Remplir à 50 ml avec ED Centrifuger 15 min à 3 000 tr/min Jeter surnageant + goutte de rouge phénol
Neutralisation	18 ml Tampon phosphate	+ solution neutralisante virage au jaune	18 ml Tampon phosphate	/	20 ml eau distillée stérile		+10 ml de solution neutralisante	18 ml tampon phosphate	Soude à 4% Virage au rose pâle
Centrifugation	20 min à 3 500 tr/min	20 min à 3 500 tr/min	20 min à 3 500 tr/min		15 min à 3000 tr/ min	15 min à 3 000 tr/min	20 min à 3 500 tr/min	20 min à 3 500 tr/min	/

Décantation	Décanter+ vortexer	Décanter + vortexer	Décanter + vortexer	/	/	Décanter et repandre le culot par 1,8 ml d'eau distillée	Décanter + vortexer Ajouter 0,2-0,5 ml phosphate pH 6,8	Décanter + vortexer	/
Ensemence- ment	4-6 Gouttes/ TB	4-6 Gouttes/ TB	4-6 Gouttes/ TB	Enduire sur milieu	4-6 Gouttes/ TB	4-6 Gouttes/ TB	4-6 Gouttes/ TB	4-6 Gouttes/ TB	4-6 Gouttes/ TB

APPENDICE D**EXPRESSION QUANTITATIVE DES RÉSULTATS DE LA BACILLO-SCOPIE**

Nbr. BAAR/ Nbr. Champs microscopique	Résultat
0/300	Négative
1-10/ 100	Douteux
10-99/ 100	+
1-10/ 1	++
Plus de 10/ 1	+++

APPENDICE E

PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE SPOLIGOTYPAGE

500 ml 2×SSPE-SDS 0.1%

- 445 ml eau distillée
- 50 ml 20×SSPE
- 5 ml SDS 10%

1000 ml 2×SSPE-SDS 0.5%

- 850 ml eau distillée
- 100 ml 20×SSPE
- 50 ml SDS 10%

500 ml 2×SSPE

- 450 ml eau distillée
- 50 ml 20×SSPE

SDS 10%

- 10 g SDS
- 100 ml eau distillée

500 ml SDS 1%

- 450 ml eau distillée
- 50 ml SDS 10%

250 ml EDTA 20 mM

- 480 ml eau distillée
- 20 ml EDTA 0.5M

APPENDICE F

AMORCES UTILISÉES POUR L'AMPLIFICATION DU SÉQUENCAGE DE SANGER

Lignées CMT	Position SNP	Changement Nucléotidique	Genre	Amorces 5'-3'	Taille sequence
Lignées 1, 2, 5	L1 4357773	G/A	Rv3878/Rv3879c	F- ACCCTCAACAACCACAACGT	386bp
	L2 4357804	T/G		R- CGACACTACCGATCAGCGTT	
	L5 4357657	G/A			
	L3 1281984	G/A		F- GATGGTCATACGCCGTTGCT	
Lignées 3, 4, 6	L4 1281771	C/T	Rv1155/intergenic region	R- CTCTTGCGGGGACTTCGATT	402bp
	L6 1281685	C/G			

APPENDICE G

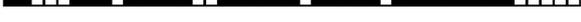
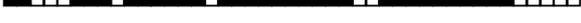
SEQUENCES D'AMORCES DE PCR ET TAILLES DE PRODUITS D'AMPLIFICATION CORRÉSPONDANTES INDIQUANT LA PRÉSENCE OU ABSENCE DE RÉGIONS GÉNOMIQUES DANS DIFFÉRENTES ESPÈCES CMT

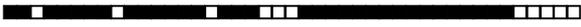
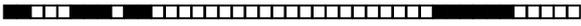
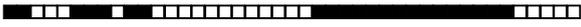
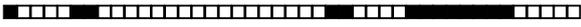
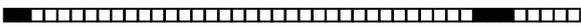
Primer sequence	RD	<i>M. canettii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. pinnipedii</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG		
AAGCGGTGCCCACCACCGACC*	1	RD1 present (146 bp)	RD1 present (146 bp)	RD1 present (146 bp)	RD1 present (146 bp)	RD1 present (146 bp)	RD1 present (146 bp)	RD1 present (146 bp)	RD1 absent (196 bp)		
CTGGCTATATTCCTGGCCCCGG*	1										
GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG*	1										
ATGTGCGAGCTGAGCGATG	4	RD4 present (172 bp)	RD4 present (172 bp)	RD4 present (172 bp)	RD4 present (172 bp)	RD4 present (172 bp)	RD4 present (172 bp)	RD4 absent (268 bp)	RD4 absent (268 bp)		
TGTAATATGCTGACCCATGCG	4										
AAAGGAGCACCATCTGCCAC	4										
CAAGTTGCCGTTTCGAGCC	9	RD9 present (235 bp)	RD9 present (235 bp)	RD9 absent (108 bp)	RD9 absent (108 bp)	RD9 absent (108 bp)	RD9 absent (108 bp)	RD9 absent (108 bp)	RD9 absent (108 bp)		
CAATGTTTGTGCGCTGC*	9										
GCTACCCTCGACCAAGTGTT*	9										
GGGAGCCAGCATTACCTC	12	RD12 absent†	RD12 present (369 bp)	RD12 present (369 bp)	RD12 present (369 bp)	RD12 present (369 bp)	RD12 absent (306 bp)	RD12 absent (306 bp)	RD12 absent (306 bp)		
GTGTTGCGGGAATTACTCGG	12										
AGCAGGAGCGGTTGGATATC	12										
CGGTCGTCGCTGTTCAAAC	1 ^{mic}			RD1 ^{mic} present (195 bp)	RD1 ^{mic} absent (127 bp)	RD1 ^{mic} present (195 bp)					
CGCGTATCGGAGACGTATTG	1 ^{mic}										
CAATCAGCCAAGACGAGGTTG	1 ^{mic}										
TCAGCGGTCTCATAGCATTGC	2 ^{seal}			RD2 ^{seal} absent†	RD2 ^{seal} present (293 bp)	RD2 ^{seal} absent (168bp)					
CGGGTTGGGAATGTCAGAAAC	2 ^{seal}										
GCGGCAAGGTACGTCAGAAC	2 ^{seal}										

APPENDICE H

NOMBRE ET PROFILS DE DIFFÉRENTS SPOLIGOTYPES

IDENTIFIÉS CHEZ L'HOMME ET LES BOVINS

Espèces/Profils	Nbr.	Bovin	Homme	SIT/SB	Clade
<i>M.bovis</i>					
	61	57	04	SB0120	Bovis1 BCG
	42	41	01	SB0121	Bovis1
	18	18	-	SB0134	Bovis1
	06	06	-	SB0339	Bovis1
	05	05	-	SB1003	-
	04	04	-	SB0828	Bovis1
	03	03	-	SB0850	Bovis1
	03	02	01	SB0860	Bovis1
	03	03	-	SB0941	-
	03	03	-	SB0838	-
	03	03	-	SB1449	-
	02	02	-	SB1200	-
	02	02	-	SB1874	-
	02	02	-	SB2695	-
	01	01	-	SB0870	Bovis1
	01	01	-	SB0818	Bovis1
	01	01	-	SB1565	-
	01	01	-	SB0856	Bov
	01	01	-	SB0871	-
	01	01	-	SB1257	-
	01	01	-	SB0822	Bovis1

	01	01	-	SB1195	-
	01	01	-	SB2180	-
	01	01	-	SB0961	-
	01	01	-	SB0867	Bov
	01	01	-	SB1568	Bovis1
	01	01	-	SB0833	Bovis1
	01	01	-	SB1142	-
	01	01	-	SB1102	-
	01	01	-	SB2520	-
	01	-	01	SB2521	-
	01	01	-	SB0837	Bovis1
	01	01	-	SB2434	-
	01	01	-	SB1327	-
	01	01	-	SB2696	-
	01	01	-	SB2697	-
	01	01	-	SB2698	-
<i>M. pinnipedii</i>					
	02	02	-	SB2402	-
	01	01	-	SB2699	-
	01	01	-	SB2701	-
<i>M. microti</i>					
	01	01	-	SB2700	-
<i>M. caprae</i>					
	02	02	-	SB0835	-
	01	01	-	SB1451	-
<i>M. tuberculosis</i>					
	08	-	08	SIT53	T1
	01	-	01	SIT86	T1
	01	-	01	SIT1129	T1

	02	-	02	SIT37	T3
	01	-	01	SIT36	H3-T3
	01	-	01	SIT196	T1
	01	-	01	SIT522	T1
	01	-	01	SIT58	T5-MAD2
	06	-	06	SIT50	H3
	03	-	03	SIT49	H3
	01	-	01	SIT99	H3
	04	-	04	SIT180	H3
	01	-	01	SIT615	H3
	01	-	01	SIT34	S
	01	-	01	SIT466	S
	14	-	14	SIT42	LAM9
	02	-	02	SIT822	LAM9
	01	-	01	SIT1074	LAM9
	03	-	03	SIT20	LAM1
	01	-	01	SIT 737	LAM9
	01	-	01	SIT1064	LAM9
	06	-	06	SIT1800	T1
	02	-	02	SIT306	T1
	02	-	02	SIT469	LAM9
	03	-	03	SIT61	LAM10-CAM
	03	-	03	SIT844	LAM10-CAM
	02	-	02	SIT47	H1
	01	-	01	SIT316	H3
	01	-	01	SIT240	U
	01	-	01	SIT775	U
	01	-	01	SIT237	U(likely H3)
	01	-	01	SIT1644	USA (1H1)
	02	-	02	SIT182	H1
	01	-	01	SIT106	U(LAM 30)
	02	-	02	SIT105	U
	01	-	01	SIT4	LAM3
Souches orphelines					
	03	-	03	-	-
	01	-	01	-	-
	01	-	01	-	-
	02	-	02	-	-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lobue, P., Enarson, D., Thoen, C., "La tuberculose chez l'homme et chez l'animal : vue d'ensemble", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.14, n°9, (2010), 1075–8.
2. Corner, L.A.L., "The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk", *Vet Microbiol*. V.112, n°2–4, (2006), 303–12.
3. World Health Organization (WHO), "Global Tuberculosis Report [Internet]. World Health Organization", Geneva, Switzerland, (2020), Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240013131>
4. Institut National de Santé Publique, "Journée mondiale de la lutte contre la tuberculose", (2019), Available from: <http://www.insp.dz/index.php/informations/journee-mondiale-tuberculose-insp.%0Ahtml>
5. Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R, et al. "Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria", *BMC Vet Res*, V.5, n°1, (2009), 4.
6. De la Rúa-Domenech, R., "Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis", *Tuberculosis*, V.86, n°2, (2006), 77–109.
7. Dürr, S., Müller, B., Alonso, S., Hattendorf, J., Laisse, C.J.M., Van Helden, P.D., et al., "Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review". *PLoS Negl Trop Dis*, V.7, n°8, (2013), 2399.
8. Ritacco, V., De Kantor, I.N., "Zoonotic tuberculosis in Latin America", *J Clin Microbiol*, V.30, n°12, (1992), 3299.
9. Pérez-Lago, L., Navarro, Y., García-de-Viedma, D., "Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review", *Res Vet Sci*. V.97, (2014), S94–100.
10. Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J., Laisse, C.J.M., Parsons, S.D.C., et al., "Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans", *Emerg Infect Dis*, V.19, n°6, (2013), 899.
11. Mathema, B., Kurepina, N.E., Bifani, P.J., Kreiswirth, B.N., "Molecular

- epidemiology of tuberculosis: current insights", *Clin Microbiol Rev*, V.19, n°4, (2006), 658–85.
12. Kamerbeek, J., Schouls, L.E.O., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., et al., "Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology", *J Clin Microbiol*, V.35, n°4, (1997), 907–14.
 13. Sahraoui, N., Muller, B., Djamel, Y., Fadéla, B., Rachid, O., Jakob, Z., et al., "Evaluation des VNTR (variable number of tandem repeats) des isolats de *Mycobacterium bovis* en Algérie", In: *Annales de biologie clinique*, (2010), 449–53.
 14. Ifticene, M., Gacem, F.Z., Yala, D., Boulahbal, F., "*Mycobacterium tuberculosis* genotype Beijing: About 15 strains and their part in MDR-TB outbreaks in Algeria", *Int J Mycobacteriology*, V.1, n°4, (2012), 196–200.
 15. Ifticene, M., Kaïdi, S., Khechiba, M.M., Yala D., Boulahbal, F., "Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Algeria: Results of spoligotyping", *Int J Mycobacteriology*, V.4, n°4, (2015), 290–5.
 16. Grozet, G et al., "Tuberculose Animale", In: *Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises*, Boehringer Ingelheim (Lyon), (2019), Available from: https://evequalif.vet-alfort.fr/pluginfile.php/60748/mod_resource/content/0/Polycopié_tuberculose_2019_VF.PDF
 17. Kerleguer, A., Koeck, J.L., Fabre, M., Foissaud, V., Teyssou, R., Hervé, V., "Apport de la biologie moléculaire au diagnostic de la tuberculose", *Rev Fr des Lab*, V.2002, n°343, (2002), 67–70.
 18. el Idrissi, A.H., "Bulletin des maladies animales transfrontières", *Empres*, V.39, n°40, (2011).
 19. Mathys, V., "Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux. Sci York, (2009).
 20. Crubézy, E., Ludes, B., Poveda, J.D., Clayton, J., Crouau-Roy, B., Montagnon, D., "Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old", *Comptes Rendus l'Académie des Sci III-Sciences la Vie*, V.321, n°11, (1998), 941–51.
 21. Barbiéri, R., Drancourt, M., "Paléomicrobiologie de la tuberculose", *Rev*

- Francoph des Lab,n°496,(2017),40–6. Available from:
[http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(17\)30374-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(17)30374-X)
22. Aronowitz, R., "The Rise of Causal Concepts of Disease: Case Histories", *Int J Epidemiol*,V.33,n°4,(2004),911–2.
 23. Berchen P., "Une histoire des microbes", John Libbey Eurotext,(2007).
 24. Laennec, R.T.H., "De l'auscultation médiate: ou, Traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur; fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration", *Culture et civilisation*,V. 2,1819.
 25. Dutau, G., "Petite histoire illustrée de la tuberculose",*Arch pédiatrie*, V.12,(2005),S88–95.
 26. Grange, J.M., "Mycobacterial diseases". Edward Arnold (Publishers) Ltd., 41 Bedford Square, London WC1B 3DQ,(1980).
 27. Grandvoinet, P., "Histoire des sanatoriums en France (1915-1945)". Une architecture en quête de rendement thérapeutique,(2010).
 28. Daniel, T.M., "Historical review",*Hist Tuberc Respir Med*,V.100,n°11,(2006),1862–70.
 29. Perutz, M.F., " La science comme aventure humaine", Odile Jacob,(2000).
 30. Canetti, G., Froman, S., Grosset, J. a.l., Hauduroy, P., Langerová ,M., Mahler, H.T., et al., "Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance",*Bull World Health Organ*,V.29,n°5,(1963),565.
 31. Rastogi, N., Goh, K.S., David, H.L., " Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion methods using Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and a radiometric method",*Res Microbiol*,V.140,n°5,(1989),405–17.
 32. Runyon, E.H., "Anonymous mycobacteria in pulmonary disease",*Med Clin North Am*,V.43,n°1,(1959),273–90.
 33. Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Rastogi, N., " Développements récents du spoligotypage appliqués à l'étude de l'épidémiologie, de la biodiversité, et de la phylogénie moléculaire du complexe *Mycobacterium tuberculosis*", *Pathol Biol*,V.48,n°10,(2000),921–32.
 34. Zink, A., Haas, C.J., Reischl, U., Szeimies,U., Nerlich, A.G.," Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population", *J Med Microbiol*,V.50,n°4,(2001),355–66.
 35. Kamerbeek, J., Schouls, L.E.O., Kolk, A., Agterveld, M.V.A.N, Soolingen,

- D.V.A.N, Kuijper, S., et al., "Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology", V.35,n°4,(1997)907–14.
36. Meyssonnier, V.," Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux", Université Pierre et Marie Curie-Paris VI,(2012).
 - 37 Harries, A.D., "Robert Koch et la découverte du bacille tuberculeux: le défi du VIH et de la tuberculose après 125 ans",Int J Tuberc Lung Dis,V.12,n°3,(2008),241–9.
 38. Towey, F., "Léon Charles Albert Calmette and Jean-Marie Camille Guérin". Lancet Respir Med,V.3,n°3,(2015),186–7.
 39. Silva, E.," Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis",Vet Microbiol,V.78,n°2,(2001),111–7.
 40. Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A., "Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC)",Vet Res,V.36,n°3,(2005),411–36.
 41. Haddad, N.," Aspects zoonotiques de la tuberculose",Bull Acad Vet Fr, V.166,n°3,(2013),214–20.
 42. Boukary, A.R., Thys, E., Mamadou, S., Rigouts, L., Matthys, F., Vias Franck, S.G., et al., "La tuberculose à *mycobacterium bovis* en Afrique subsaharienne",Ann Med Vet,V.155,n°1,(2011),23–37.
 43. Munang'andu, H.M., Siamudaala, V.M., Nambota, A., Bwalya, J.M., Munyeme, M., Mweene, A.S., et al.," Disease constraints for utilization of the African buffalo (*Syncerus caffer*) on game ranches in Zambia",Jpn J Vet Res,V.54,n°1,(2006),3–13.
 44. Steele, J.H.," Regional and country status report. *Mycobacterium bovis* Infect Anim humans Iowa State", Univ Press Ames,IA,(1995),169–72.
 45. Zignol, M., Hosseini, M.S., Wright, A., Weezenbeek, C.L., Nunn, P., Watt, C.J., et al.," Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis",J Infect Dis, V.194,n°4(2006),479–85.
 46. Ashford, D.A, Whitney, E., Raghunathan, P., Cosivi, O., "Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals"Rev Sci Tech, V.20,n°1,(2001)325.
 47. Michel, A.L., Müller, B., Van Helden, P.D.," *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not?",Vet Microbiol,V.140,n°3–

- 4,(2010),371–81.
48. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., et al., "A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex", *Proc Natl Acad Sci*, V.99, n°6(2002), 3684–9.
 49. Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M.C., Poyart, C., "Bactériologie Médicale: Techniques Usuelles", Elsevier Masson SAS Éditeur, (2016), Available from: <https://books.google.dz/books?id=SfDQDwAAQBAJ>
 50. Mougari, F., Cambau, E., "Mycobactéries et eau", *Rev Francoph des Lab*, V.2014, n°460, (2014), 69–74.
 51. Barbier, E., "Prévalence de *Mycobacterium bovis* dans les agroécosystèmes: analyse de réservoirs environnementaux potentiels (sol, eau douce, faune du sol et faune aquatique) et traçage de la circulation de cette bactérie entre les différents compartiments", (2016).
 52. van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M.J., Simeone, R., Brosch, R., et al., "Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies", *Emerg Infect Dis*, V.18, n°4(2012), 653.
 53. Banuls, A.L., Sanou, A., Van Anh, N.T., Godreuil, S., "3 *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium", *J Med Microbiol*, V.6, n°(11(2015), 1261–9.
 54. Velayati, A.A., Farnia, P., "Atlas of *Mycobacterium tuberculosis*", Academic Press, (2016).
 55. Dumont, Y., Lounnas, M., Carrière, C., Solassol, J., Bañuls, A.L., Godreuil, S., "Tuberculose bovine: une maladie globalisée à l'interface homme-animal", *Rev Francoph des Lab*, V.2018, n°503, (2018) 58–63.
 56. Annetti, N., Anne, L., Alexander, B., Dominique, S., "Manuel de dépistage de la tuberculose bovine: anomalies détectables lors du contrôle des viandes", Schwarzenb, Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires OSAV, (2014), 40.
 57. Hars, J., Boschioli, M.L., Duvauchelle, A., Garin-Bastuji, B., "La tuberculose à *Mycobacterium bovis* chez le cerf et le sanglier en France. Émergence et risque pour l'élevage bovin", *Bull Acad Vet Fr*, (2006).
 58. Castets, M., Sarrat, H., "Bacteriologic aspects of mycobacteria isolated at Dakar in 1967", *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr*, .13, n°3, (1968) 463–9.
 59. De Jong, B.C., Antonio, M., Gagneux, S., "*Mycobacterium africanum*—review

- of an important cause of human tuberculosis in West Africa", *PLoS Negl Trop Dis*, V.4, n°9(2010), e744.
60. Cadmus, S., Palmer, S., Okker, M., Dale, J., Gover, K., Smith, N., et al., "Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria", *J Clin Microbiol*, V.44, n°1, (2006), 29–34.
 61. Rahim, Z., Mollers, M., Koppele-Vije, A .t., de Beer, J., Zaman, K., Matin, M.A., et al., "Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping", *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, V.38, n°4, (2007), 706.
 62. Thorel, M.F., "Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys Thorel, Marie Françoise", *Tubercle*, V.61, n°2, (1980), 101–4.
 63. De Jong, B.C., Antonio, M., Awine, T., Ogungbemi, K., De Jong, Y.P., Gagneux, S., et al., "Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in The Gambia", *J Clin Microbiol*, V.47, n°4, (2009), 994–1001.
 64. Aboubaker Osman, D., Bouzid, F., Canaan, S., Drancourt, M., "Smooth tubercle bacilli: neglected opportunistic tropical pathogens", *Front public Heal*, (2016), 3:283.
 65. Astier, H., Briquet, A., Garnotel, E., " *Mycobacterium canettii* , une mycobactérie du complexe tuberculosis", *Rev Francoph des Lab* , V.2017, n°496, (2017), 47–59. 65.
 66. Dufour, B., Bénet, J.-J., "L'infection à *Mycobacterium bovis* en France en 2014: recrudescence et inquiétudes", *Rev Francoph des Lab*, V, n°472, (2015), 67–75.
 67. Forshaw, D., Phelps, G.R., "Tuberculosis in a captive colony of pinnipeds", *J Wildl Dis*, V.27, n°2, (1991), 288–95.
 68. Cousins, D. V, Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., et al., "Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov", *J Med Microbiol*, V.53, n°5, (2003), 1305–14.
 69. Tortoli E., " The new mycobacteria: an update", *FEMS Immunol Med Microbiol*, V.48, n°2, (2006), 159–78.
 70. Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., et al., "*Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a

- taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain", *Int J Syst Evol Microbiol*, V.49,n°3,(1999),1263–73.
71. Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L., "Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov", *Int J Syst Evol Microbiol*, V.53,n°6,(2003),1785–9.
 72. Niemann, S., Richter, E., Rüscher-Gerdes, S., " 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*, V.52,n°2,(2002),433–6.
 73. Prodinger, W.M., Brandstätter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica ,T., Boschioli, M.L., et al., " Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping", *J Clin Microbiol*, V.43,n°10,(2005),4984–92.
 74. Wells, A.Q., "Tuberculosis in wild voles", *Lancet*,(1937).
 75. Brooke, W.S., " The Vole Acid-fast Bacillus: I. Experimental Studies on a New Type of *Mycobacterium tuberculosis* From the Sir Wm", *Dunn School of Pathology, University of Oxford, England. Am Rev Tuberc*, V.43,n°6,(1941),806–16.
 76. Cavanagh, R., Begon, M., Bennett, M., Ergon, T., Graham, I.M., de Haas, P.E.W., et al., " *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations", *J Clin Microbiol*, V.40,n°9,(2002),3281–5.
 77. Burthe, S., Bennett, M., Kipar, A., Lambin, X., Smith, A., Telfer, S., et al., " Tuberculosis (*Mycobacterium microti*) in wild field vole populations", *Parasitology*, V.135,n°3,(2008),309.
 78. Emmanuel, F.X., Seagar, A.L, Doig, C., Rayner, A., Claxton, P., Laurenson, I., " Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland", *Emerg Infect Dis*, V.13,n°12,(2007),1924.
 79. Jahans, K., Palmer, S., Inwald, J., Brown, J., Abayakoon, S., " Isolation of *Mycobacterium microti* from a male Charolais-Hereford cross", *Vet Rec*, V.155,n°12,(2004),373–4.
 80. Deforges, L., Boulouis, H.J, Thibaud, J.L., Boulouha, L., Sougakoff, W., Blot,

- S., et al., " First isolation of *Mycobacterium microti* (Llama-type) from a dog", *Vet Microbiol*,V.103,n°(3–4),(2004),249–53.
81. Smith, N.H., Crawshaw, T., Parry, J., Birtles, R.J., " *Mycobacterium microti*: more diverse than previously thought", *J Clin Microbiol*,V.47,n°8(2009),2551–9.
 82. Van Soolingen, D., Van Der Zanden, A.G.M., De Haas, P.E.W., Noordhoek, G.T., Kiers A., Foudraine N.A., et al., " Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers", *J Clin Microbiol*,V.36,n°7,(1998),1840–5.
 83. Lévy-Frébault, V.V., Portaels F., " Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species", *Int J Syst Evol Microbiol*,V.42,n°2,(1992),315–23.
 84. Sola, L., Radkovsky, J., " Protective effects of *M. microti* vaccine against tuberculosis" ., " *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*,V.20,n°1,(1976),1–6.
 85. Hart, P., Sutherland I., " BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life", *Br Med J*, V.2,n°6082,(1977),293–5.
 86. Lomme, J.R., Thoen, C.O., Himes, E.M., Vinson, J.W., King, R.E., " *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes", *J Am Vet Med Assoc*,V.169,n°9,(1976),912–4.
 87. Pittius, N.C.G van., Perrett, K.D., Michel, A.L., Keet, D.F., Hlokwe, T., Streicher, E.M., et al., " Infection of African buffalo (*Syncerus caffer*) by oryx bacillus, a rare member of the antelope clade of the *Mycobacterium tuberculosis* complex", *J Wildl Dis*,V.48,n°4(2012),849–57.
 88. Alexander, K.A., Pleydell, E., Williams, M.C, Lane, E.P, Nyange, J.F.C, Michel, A.L., " *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife", *Emerg Infect Dis*,V.8,n°6,(2002),598.
 89. Alexander, KA., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D, Warren, R.M., et al., " Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*", *Emerg Infect Dis*,V.168,(2010),1296.
 90. Wagner, J.C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., Levisseur, S., " An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas)", *Nature*,V.181,n°4604,(1958),284–5.
 91. Dippenaar, A., Parsons, S.D.C., Sampson, S.L., Van Der Merwe, R.G.,

- Drewe, J.A., Abdallah, A.M., et al., "Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*", *Tuberculosis*, V.95, n°6, (2015), 682–8.
92. Sasaki, S., Takeshita, F., Okuda, K., Ishii, N., "*Mycobacterium leprae* and leprosy: a compendium", *Microbiol Immunol*, V.45, n°11, (2001), 729–36.
 93. Lambert, S.M., Walker, S.L., Harnisch, J.P., "Leprosy (Hansen's Disease). In: *The Travel and Tropical Medicine Manual*", Elsevier, (2017), 513–23.
 94. Rojas-Espinosa, O., "Murine leprosy revisited. Curr Top profiles host Immunol response to Mycobact Infect Spec Immunol", *Rev Book Trivandrum, India Res Signpost*, (2009), 97–140.
 95. Stefansky W.K., *Zabolevanija u krys, vyzvannyja kislotoupornoj palotsjkoj. Rus Vratsj*, V.47(1902), 1726–7.
 96. Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., 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*, V.175, n°4, (2007), 367–416.
 97. Ndishimye, P., "Tuberculose en Roumanie: Contribution à la mise en évidence des facteurs de risque et des caractéristiques cliniques et biologiques des patients hospitalisés dans la région de Cluj-Napoca", (2016).
 98. Mougari, F., Guglielmetti, L., Lopes, A., Raskine, L., Cambau, E., "Mycobactérioses non tuberculeuses hors mycobactérioses cutanées", *Rev Encycl Médico Chir*, V.8, n° 038 C10, (2013), 38392–8.
 99. Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A., Actor, J.K., "Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice", Elsevier, (2017).
 100. Radomski, N., Thibault, V.C., Karoui, C., de Cruz, K., Cochard, T., Gutiérrez, C., et al., "Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods", *J Clin Microbiol*, V.48, n°4, (2010), 1026–34.
 101. Van Ingen, J., Bendien, S.A., De Lange, W.C.M., Hoefsloot, W., Dekhuijzen, P.N.R., Boeree, M.J., et al., "Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region", *The Netherlands Thorax*, V.64, n°6, (2009), 502–6.

102. Vincent, V., Gutierrez, M.C., "*Mycobacterium marinum*", *Antibiotiques*, V.7,n°2,(2005),133–7.
103. Falkinham, J.O., "Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria", *Clin Microbiol Rev*, V.9,n°2,(1996),177.
104. Dailloux, M., Laurain, C., Weber, M., Hartemann, P.H., "Water and nontuberculous mycobacteria", *Water Res*, V.33,n°10,(1999),2219–28.
105. Darie, H., "Infection par *Mycobacterium ulcerans*: aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques", *Bull la Société Pathol Exot*, V.96,n°5,(2003),368–71.
106. Coetzer, J.A.W., Tustin, R.C., "Infectious diseases of livestock", *Infect Dis livestock*, V.3,n°2,(2004).
107. Vincent, V., "Taxonomie des mycobactéries", *Rev Française des Lab*, V.1995,n°273,(1995),27–31.
108. Thorel, M.F., "Tuberculose", *Princ Mal Infect Parasit du Bétail, Eur Régions Chaudes*,(2003),927–61.
109. Roux, A.L., Herrmann, J.L., Gaillard, J.L., Rottman, M., "*Mycobacterium abscessus*, pathogène émergent dans la mucoviscidose", *Immuno-analyse Biol Spécialisée*, V.25,n°1,(2010),26–33.
110. Bourgoin, A., Agius, G., "Le point sur les méthodes classiques d'identification des mycobactéries", *Rev Française des Lab*, V.1995,n°273,(1995),21–6.
111. Trujillo, M.E., Velazquez, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Rivas, R., Mateos, P.F., et al., "*Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine", *Int J Syst Evol Microbiol*, V.54,n°5,(2004),1459–63.
112. Percival, S.L., Williams, D.W., "*Mycobacterium*", *Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier, (2014),177–207.
113. Andréjak, C., Lescure, F.X, Schmit, J.L, Jounieaux, V., "Diagnostic et traitement des mycobactérioses atypiques d'expression respiratoire", *Rev Mal Respir*, V.28,n°10,(2011),1293–309.
114. Baess, I., Bentzon, M.W., "Deoxyribonucleic acid hybridization between different species of mycobacteria", *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B Microbiol*, V.86,n°1-6,(1978),71–6.
115. ROGALL, T., WOLTERS, J., FLOHR, T., BÖTTGER, EC., "Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus

- Mycobacterium*", Int J Syst Evol Microbiol, V.40, n°4, (1990), 323–30.
116. MAGEE J.G, WARD A.C., "Family III. Mycobacteriaceae Chester 1897, 63AL", Bergey's Man Syst Bacteriol Actinobacteria, V.5, (2012), 312.
 117. Grange, J.M., "The genus *Mycobacterium* and the *Mycobacterium tuberculosis complex*", Tuberc a Compr Clin Ref Philadelphia, PA Saunders, (2009), 44–59.
 118. Davidson, M.W., "Molecular expressions. Cell biology and microscopy, structure and function of cells and viruses", The Florida State University, (1995).
 119. Singh, P., Rameshwaram, N.R., Ghosh, S., Mukhopadhyay, S., "Cell envelope lipids in the pathophysiology of *Mycobacterium tuberculosis*". Future Microbiol, V.13, n°06, (2018), 689–710.
 120. Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L.T., Vollmer, W., Keep, N.H., et al., "Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. FEMS Microbiol Rev, V.43, n°5, (2019), 548–75.
 121. Abrahams, K.A., Besra, G.S., "Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target", Parasitology, V.145, n°2, (2018), 116–33.
 122. Dulberger, C.L., Rubin, E.J., Boutte, C.C., "The mycobacterial cell envelope—a moving target", Nat Rev Microbiol, (2019), 1–13.
 123. Haddad, N., Masselot, M., Durand, B., "Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates", Review of main techniques and applications, Res Vet Sci, V.76, n°1, (2004), 1–18.
 124. Cole, S.t., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al., "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence", Nature, V.393, n°6685, (1998), 537–44.
 125. Brennan, M.J., Delogu, G., "The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria", Trends Microbiol, V.10, n°5, (2002) 246–9.
 126. Delogu, G., Brennan, M.J., "Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*", Infect Immun, V.69, n°9, (2001), 5606–11.
 127. Dillon, D.C., Alderson, M.R., Day, C.H., Lewinsohn, D.M., Coler, R., Bement, T., et al., "Molecular characterization and human t-cell responses to a member of a novel *Mycobacterium tuberculosis* mtb39Gene family", Infect Immun, V.67, n°6, (1999), 2941–50.

128. Collins, C.H., Grange, J.M., Yates, M.D., "Tuberculosis bacteriology: organization and practice", Butterworth Heinemann,(1997).
129. Talarico, S., Cave, M.D., Marrs, C.F., Foxman, B., Zhang, L., Yang, Z., "Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 gene among clinical isolates", J Clin Microbiol, V.43, n°10, (2005), 4954–60.
130. Smith, I., " *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence", Clin Microbiol Rev, V.16, n°3, (2003), 463–96.
131. Sharma, S.K., Mohan, A., "Tuberculosis", Jaypee Brothers Medical, (2008), Available from: <https://books.google.dz/books?id=MOkxPwAACAAJ>
132. Stahl, D.A., Urbance, J.W., "The division between fast-and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria" J Bacteriol, V.172, n°1, (1990), 116–24.
133. Denis, F., "Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant", John Libbey Eurotext (2002), (MS. Médecine sciences. Sélection). Available from: <https://books.google.dz/books?id=zrmau4bGPGgC>
134. Livanainen, E., Martikainen, P.J., Katila ,M., "Effect of freezing of water samples on viable counts of environmental mycobacteria", Lett Appl Microbiol, V.21, n°4, (1995), 257–60.
135. Verma, A.K., Tiwari, R., Chakraborty, S., Neha Saminathan, M., Dhama, K., et al., "Insights into bovine tuberculosis (bTB), various approaches for its diagnosis, control and its public health concerns: An update", Asian J Anim Vet Adv, V.9, n°6, (2014), 323–44.
136. Tanner, M., Michel, A.L., "Investigation of the viability of *M. bovis* under different environmental conditions in the Kruger National Park", (1999).
137. Morris R.S., Pfeiffer D.U., Jackson R., "The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections", Vet Microbiol, V.40, n°1–2, (1994), 153–77.
138. Jabir, R.A., Rukmana, A., Saleh, I., Kurniawati, T., "The Existence of *Mycobacterium tuberculosis* in Microenvironment of Bone", Mycobacterium Res Dev, (2018), 41.
139. Ghodbane, R., Medie, F.M., Lepidi, H., Nappez, C., Drancourt, M., "Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil", Microbiology, V.160, n°3, (2014), 496–501.
140. Brown, T., Nikolayevskyy, V., Velji, P., Drobniewski F., "Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes", Emerg Infect

- Dis,V.16,n°2,(2010),272.
141. Primm, T.P., Lucero, C.A., Falkinham, J.O., " Health impacts of environmental mycobacteria",*Clin Microbiol Rev*,V.17,n°1,(2004),98–106.
 142. El Helou, G., Viola, G.M., Hachem, R., Han, X.Y., Raad, I.I., "Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections",*Lancet Infect Dis*, V.13,n°2,(2013),166–74.
 143. Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., et al., " Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria",*Mol Microbiol*, V.69,n°1,(2008),164–74.
 144. Adékambi, T., Salah, S.Ben., Khlif, M., Raoult, D., Drancourt, M.," Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*",*Appl Environ Microbiol*,V.72,n°9,(2006),5974–81.
 145. Drancourt, M., Adekambi, T., Raoult, D.," Interactions between *Mycobacterium xenopi*, amoeba and human cells",*J Hosp Infect*, V.65,n°2,(2007),138–42.
 146. Greub, G., Raoult, D.," Microorganisms resistant to free-living amoebae", *Clin Microbiol Rev*,V.17,n°2,(2004),413–33.
 147. Whan, L., Grant, I.R., Rowe, M.T., Interaction between *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and environmental protozoa",*BMC Microbiol*, V.6,n°1,(2006),63.
 148. Miltner, E.C., Bermudez, L.E.,"*Mycobacterium avium* Grown in *Acanthamoeba castellanii* Is Protected from the Effects of Antimicrobials", *Antimicrob Agents Chemother*,V.44,n°7,(2000),1990–4.
 149. Hmama, Z., Peña-Díaz, S., Joseph, S., Av-Gay, Y., "Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*", *Immunol Rev*,V.264,n°1,(2015),220–32.
 150. Rao, N., Meena, L.S., "Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and cord factor: an overview", *Biotechnol Res Int*,(2011).
 151. Dao, D.N., Kremer, L., Guérardel, Y., Molano, A., Jacobs, W.R., Porcelli, S.A., et al.," *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages",*Infect Immun*,V.72,n°4,(2004),2067–74.

152. Guérardel, Y., Maes, E., Briken, V., Chirat, F., Leroy, Y., Loch, C., et al., "Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii* novel structural features and apoptosis-inducing properties", *J Biol Chem*, V. 278, n°38, (2003), 36637–51.
153. Knutson, K.L., Hmama, Z., Herrera-Velitz, P., Rochford, R., Reiner, N.E., "Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Protein Tyrosine Dephosphorylation and Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase in Human Mononuclear Phagocytes ROLE OF THE Src HOMOLOGY 2 CONTAINING TYROSINE PHOSPHATASE 1", *J Biol Chem*, V.273, n°1, (1998), 645–52.
154. Vergne and Daffé, M., "Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells", *Front. Biosci*, V.3, n°1, (1998), d865-876.
155. Indrigo, J., Hunter, R.L., Actor, J.K., "Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages", *Microbiology*, V.148, n°7, (2002), 1991–8.
156. Hunter, R.L., Armitage, L., Jagannath, C., Actor J.K., "tuberculosis", V.89, n°0 1, (2013), 1–20.
157. Lang, R., "Recognition of the mycobacterial cord factor by Mincle : relevance for granuloma formation and resistance to tuberculosis", V.4, (2013), 1–7.
158. Zhang, L., English, D., Andersen, B.R., "Activation of human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid-1", *J Immunol*, V.146, n°8, (1991), 2730–6.
159. Alihalassa, S., "Comprendre l'épidémiologie de la tuberculose en Algérie", *Rev Mal Respir*, V.35, (2018), A234–5.
160. World Health Organization (WHO)., "World Report on Ageing and Health", (2015), Available from: <https://www.who.int/ageing/events/world-report-2015-launch/en/>
161. World Health Organization (WHO)., "Roadmap for zoonotic tuberculosis", (2017), Available from: https://www.who.int/tb/publications/2017/zoonotic_TB/en/
162. Allen, A.R., Skuce, R.A., Byrne, A.W., "Bovine tuberculosis in Britain and Ireland—A perfect storm? the confluence of potential ecological and epidemiological impediments to controlling a chronic infectious disease", *Front Vet Sci*, V.5, (2018), 109.

163. Humblet, M.F., Boschioli, M.L., Saegerman, C., "Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach", *Vet Res*, V.40,n°5,(2009),1–24.
164. Thoen, C.O., LoBue, P.A., Enarson, D.A., Kaneene, J.B., de Kantor, I.N., "Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans",(2009).
165. Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., et al., " Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries", *Emerg Infect Dis*, V.4,n°1,(1998),59.
166. Demelash, B., Inangolet, F., Oloya, J., Asseged, B., Badaso, M., Yilkal, A., et al., " Prevalence of bovine tuberculosis in Ethiopian slaughter cattle based on post-mortem examination", *Trop Anim Health Prod*, V.41,n°5,(2009),755–65.
167. De Kantor, I.N., Ritacco, V., " An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries", *Vet Microbiol*, V.112,n°2–4,(2006),111–8.
168. de Kantor, I.N., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Telles, M.A.D.S., Ribeiro, M.O., et al., "Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries", *Tuberculosis*, V.88,n°4,(2008),358–65.
169. Sanou, A., Tarnagda, Z., Kanyala, E., Zingué, D., Nouctara, M., Ganamé, Z., et al., " *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates", *PLoS Negl Trop Dis*, V.8,n°10,(2014),e3142.
170. Kelly R.F., Hamman S.M., Morgan K.L., Nkongho E.F., Ngwa V.N., Tanya V., et al., " Knowledge of bovine tuberculosis, cattle husbandry and dairy practices amongst pastoralists and small-scale dairy farmers in Cameroon", *PLoS One*, V.11,n°1,(2016),e0146538.
171. Youssef, A.I., Ahmed, A.M., " Bovine tuberculosis survey based on meat inspection and microscopic examination in central city abattoir in Ismailia, Egypt and its hazards to the abattoir workers", *Int Food Res*, V.21,n°2,(2014).
172. Atiadeve, S.K., Gyamfi, O.K., Mak-Mensah, E., Galyuon, I.K.A, Owusu, D., Bonsu F.A., et al., " Slaughter surveillance for tuberculosis among cattle in three metropolitan abattoirs in Ghana", *J Vet Med Anim Heal*, V.6,n°7,(2014),198–207.
173. Ghebremariam, M.K., Hlokwe, T., Rutten, V.P.M.G., Allepuz, A., Cadmus, S., Muwonge, A., et al., " Genetic profiling of *Mycobacterium bovis* strains from

- slaughtered cattle in Eritrea", *PLoS Negl Trop Dis*, V.12,n°4,(2018),e0006406.
174. Müller, B., Steiner, B., Bonfoh, B., Fané, A., Smith, N.H., Zinsstag, J., "Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali", *BMC Vet Res*, V.4,n°1,(2008),1–6.
175. Diallo, M., Diarra, B., Sanogo, M., Togo, A.C.G., Somboro, A.M., Diallo, M.H., et al., "Molecular identification of *Mycobacterium bovis* from cattle and human host in Mali: expanded genetic diversity", *BMC Vet Res*, V.12,n°1,(2016),145.
176. Yahyaoui-Azami, H., Aboukhassib, H., Bouslikhane, M., Berrada, J., Rami, S., Reinhard, M., et al., "Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco", *BMC Vet Res*, V.13,n°1,(2017),272.
177. Boukary, A.R., Thys, E., Rigouts, L., Matthys, F., Berkvens, D., Mahamadou, I., et al., "Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in Niger", *Transbound Emerg Dis*, V.59,n°6,(2012),490–502.
178. Sa'idu, A.S., Okolocha, E.C., Dzikwi, A.A., Kwaga, J.K.P., Gamawa, A.A., Usman, A., et al., "Detection of *Mycobacterium bovis* in organs of slaughtered cattle by DNA-based polymerase chain reaction and Ziehl-Neelsen techniques in Bauchi State, Nigeria", *J Vet Med*,(2015).
179. Ahmad, I., Kudi, C.A., Abdulkadir, A.I., Saidu, S.N.A., "Occurrence and distribution of bovine TB pathology by age, sex, and breed of cattle slaughtered in Gusau Abattoir, Zamfara State Nigeria", *Trop Anim Health Prod*, V.49,n°3,(2017),583–9.
180. Adelakun, O.D., Akinseye, V.O., Adesokan, H.K., Cadmus, S.I.B., "Prevalence and Economic Losses Due to Bovine Tuberculosis in Cattle Slaughtered at Bodija Municipal Abattoir, Ibadan, Nigeria", *Folia Vet*, V.63,n°1,(2019),41–7.
181. Habarugira, G., Rukelibuga, J., Nanyingi, M.O., Mushonga, B., "Bovine tuberculosis in Rwanda: Prevalence and economic impact evaluation by meat inspection at Société des Abattoirs de Nyabugogo-Nyabugogo Abattoir, Kigali", *J S Afr Vet Assoc*, V.85,n°1,(2014),1–5.
182. Bhembe, N.L., Tanih, G.N., Caine, L.A., Pekana, A., Govender, P., Nwodo, U.U., et al., "Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Cattle Lymph Nodes in Eastern Cape Province", *Biomed Res Int*,(2018).

183. El Tigani, A., El Sanousi, S.M., Gameel, A., El Beir, H., Fathelrahman, M., Terab, N.M., et al., "Bovine tuberculosis in South Darfur State, Sudan: an abattoir study based on microscopy and molecular detection methods", *Trop Anim Health Prod*, V.45, n°2, (2013), 469–72.
184. Diguimbaye-Djaibé, C., Hilty, M., Ngandolo, R., Mahamat, H.H., Pfyffer, G.E., Baggi, F., et al., " *Mycobacterium bovis* isolates from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses", *Emerg Infect Dis*, V.12, n°5, (2006), 769.
185. Nalapa, D.P., Muwonge, A., Kankya, C., Olea-Popelka, F., "Prevalence of tuberculous lesion in cattle slaughtered in Mubende district, Uganda", *BMC Vet Res*, V.13, n°1, (2017), 73.
186. Munyeme, M., Rigouts, L., Shamputa, I.C., Muma, J.B., Tryland, M., Skjerve, E., et al., "Isolation and characterization of *Mycobacterium bovis* strains from indigenous Zambian cattle using Spacer oligonucleotide typing technique", *BMC Microbiol*, V.9, n°1, (2009), 144.
187. Djafar, Z.R., Benazi, N., Bounab, S., Sayhi, M., Diouani, M.F., Benia, F., "Distribution of seroprevalence and risk factors for bovine tuberculosis in east Algeria", *Prev Vet Med*, V.183: (2020), 105127.
188. Abdelhanine, A., BENSID, A., BENABDELHAK, A.C., Fatima, A.Y., DERGAL, N.B., "First Report on Tuberculosis Based on Slaughterhouse Data in Bejaia Province, Algeria: A Retrospective 10-Year Survey", *Kocatepe Vet Derg*, V.13, n°2, (2020), 1.
189. Hamiroune, M., Dahmane, M., Charef, A., Cheniguel, H., Foughalia, H., Saidani, K., et al. "Evaluation of Fascioliasis, Hydatidosis, and Tuberculosis in Domestic Animals during *Post-Mortem* Inspection at Jijel Slaughterhouse (Algeria)", *J food Qual hazards Control*, (2020).
190. Rani, N., "Historical Perspectives and Epidemiology of Bovine Tuberculosis", *Int J Pure Appl Biosci*, V.5, n°5, (2017), 1406–14.
191. World Health Organization (WHO). "Global Tuberculosis Report", Geneva, Switzerland, (2019), Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/global-tuberculosis-report-2019>
192. Thoen, C.O., LoBue, P.A., de Kantor, I., "Why has zoonotic tuberculosis not received much attention?", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.14, n°9, (2010), 1073–4.
193. Drobniowski, F., Strutt, M., Smith, G., Magee, J., Flanagan, P., "Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium*

- bovis* by hospital laboratories in England and Wales", *Epidemiol Infect*, V.130,n°2,(2003),235–7.
194. Grange, J.M." *Mycobacterium bovis* infection in human beings", *Tuberculosis*,V.81,n°1–2,(2001),71–7.
 195. Nuru, A., Mamo, G., Zewude, A., Mulat, Y., Yitayew, G., Admasu, A., et al.," Preliminary investigation of the transmission of tuberculosis between farmers and their cattle in smallholder farms in northwestern Ethiopia: a cross-sectional study", *BMC Res Notes*,V.10,n°1,(2017),31.
 196. Berg, S., Schelling, E., Hailu, E., Firdessa, R., Gumi, B., Erenso, G., et al., "Investigation of the high rates of extrapulmonary tuberculosis in Ethiopia reveals no single driving factor and minimal evidence for zoonotic transmission of *Mycobacterium bovis* infection",*BMC Infect Dis*, V.15,n°1,(2015),1–10.
 197. Oloya, J., Opuda-Asibo, J., Kazwala, R., Demelash, A.B., Skjerve, E., Lund, A., et al., "Mycobacteria causing human cervical lymphadenitis in pastoral communities in the Karamoja region of Uganda", *Epidemiol Infect*, V.136,n°5,(2008),636–43.
 198. Zewdie, O., Mihret, A., Ameni, G., Worku, A., Gemechu, T., Abebe, T., "Molecular typing of mycobacteria isolated from tuberculous lymphadenitis cases in Addis Ababa, Ethiopia",*Int J Tuberc Lung Dis*,V.20,n°11,(2016),1529–34.
 199. Mawak, J.D., Gomwalk, N.E., Bello, C.S.S., Kandakai-Olukemi, Y.T.," Human pulmonary infections with bovine and environment (atypical) mycobacteria in Jos, Nigeria", *Ghana Med J*,V.40,n°3,(2006).
 200. Aliyu, G., El-Kamary, S.S., Abimiku, A., Brown, C., Tracy, K., Hungerford, L., et al., "Prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Nigeria",*PLoS One*,V.8,n°5,(2013),e63170.
 201. Lawson, L., Zhang, J., Gomgnimbou, M.K., Abdurrahman, S.T., Le Moullec, S., Mohamed, F., et al., "A molecular epidemiological and genetic diversity study of tuberculosis in Ibadan, Nnewi and Abuja, Nigeria", *PLoS One*, V.7,n°6,(2012),e38409.
 202. Ghariani, A., Jaouadi, T., Smaoui, S., Mehiri, E., Marouane, C., Kammoun, S., et al., "Diagnosis of lymph node tuberculosis using the GeneXpert MTB/RIF in Tunisia", *Int J mycobacteriology*,V.4,n°4,(2015),270–5.

203. Siala, M., Smaoui, S., Taktak, W., Hachicha, S., Ghorbel, A., Marouane, C., et al., "First-time detection and identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex members in extrapulmonary tuberculosis clinical samples in south Tunisia by a single tube tetraplex real-time PCR assay", *PLoS Negl Trop Dis*, V.11, n°5, (2017), e0005572.
204. Malama, S., Johansen, T.B., Muma, J.B, Munyeme, M., Mbulo, G., Muwonge, A., et al., "Characterization of *Mycobacterium bovis* from humans and Cattle in Namwala District, Zambia", *Vet Med Int*, (2014).
205. Malama, S., Muma, J.B., Olea-Popelka, F., Mbulo, G., "Isolation of *mycobacterium bovis* from human sputum in Zambia: public health and diagnostic significance", *J Infect Dis Ther*, V.1, n°114, (2013), 2.
206. Addo, K.K., Owusu-Darko, K., Yeboah-Manu, D., Caulley, P., Minamikawa, M., Bonsu, F., et al., "Mycobacterial species causing pulmonary tuberculosis at the korle bu teaching hospital, Accra", *Ghana Med J*, V.41, n°2, (2007).
207. Otchere, I.D., Van Tonder, A.J., Asante-Poku, A., Sánchez-Busó, L., Coscollá, M., Osei-Wusu, S., et al., "Molecular epidemiology and whole genome sequencing analysis of clinical *Mycobacterium bovis* from Ghana", *PLoS One*, V.14, n°3, (2019), e0209395.
208. Prevention C for DC and. *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) in humans. Cent Dis Control Prev factsheets (2012).
209. Majoor, C.J., Magis-Escurra, C., van Ingen, J., Boeree, M.J., van Soolingen, D., "Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993–2007", *Emerg Infect Dis*, V.17, n°3, (2011), 457.
210. Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J., " Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle", *Vet Microbiol*, V.40, n°1–2, (1994), 41–52.
211. Neill, S.D., Bryson, D.G., Pollock, J.M., " Pathogenesis of tuberculosis in cattle", *Tuberculosis*, V.8, n°1–2, (2001), 79–86.
212. Menzies, F.D., Neill, S.D., " Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis", *Vet J*, V.160, n°2, (2000), 92–106.
213. Vural, S.A., Tunca, R., "Generalized tuberculosis in a 45 day-old calf", *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, V.108, n°11, (2001), 468–70.
214. Menzies, F.D., Abernethy, D.A., Stringer, L.A., Honhold, N., Gordon, A.W., "A matched cohort study investigating the risk of *Mycobacterium bovis* infection

- in the progeny of infected cows", *Vet J*,V.194,n°3,(2012),299–302.
215. Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Neill, S.D., "Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*", *Vet Rec*,V.144,n°6,(1999),139–42.
 216. Liebana, E., Johnson, L., Gough, J., Durr, P., Jahans, K., Clifton-Hadley, R., et al., "Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales", *Vet J*,V.176,n°3,(2008),354–60.
 217. Che, D., Antoine, D., "de la tuberculose", *Rev Prat*,(2012),62:473.
 218. Rose, J.r C.E., Zerbe G.O., Lantz S.O., Bailey W.C., "Establishing priority during investigation of tuberculosis contacts", *Am Rev Respir Dis*,V.119,n°4,(1979),603–9.
 219. Van Geuns, H.A.," Results of contact examination in Rotterdam, 1967-1969", *Bull Int Union Tuberc*,V.50,(1975),107–21.
 220. Grzybowski, S., "Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis", *Bull IUAT*,V.1975, 90–106.
 221. Cruz, A.T., Medina, D., Whaley, E.M., Ware, K.M., Koy, T.H., Starke, J.R., "Tuberculosis among families of children with suspected tuberculosis and employees at a children's hospital", *Infect Control Hosp Epidemiol*, V.32,n°2,(2011),188–90.
 222. Starke, J.R., "Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to and from children and adolescents", In: *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, Elsevier,(2001),115–23.
 223. Society, A.T., " standards and classification of tuberculosis in adults and children",*Am J Respir Crit Care Med*,V.161,(2000),1376–95.
 224. Society AT, Prevention C for DC and, America IDS of,American thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of america: "controlling tuberculosis in the United States", *Am J Respir Crit Care Med*,V.172,n°9,(2005),1169–227.
 225. Beals, F.T., The risk of Bovine Tuberculosis from raw milk consumption with a focus on Michigan in wise traditions in food, farming and the healing arts, the quarterly magazine of the Weston A", Price Found, (2007).
 226. O'Donohue ., Bedi, S., Bittner, M.J., Preheim, L.C., "Short-course chemotherapy for pulmonary infection due to *Mycobacterium bovis*", *Arch Intern Med*,V.145,n°4,(1985),703–5.
 227. Ofukwu, R.A., "Studies on the epidemiology of bovine and human tuberculosis

- in Benue State, Nigeria", A Ph D Diss Fac Vet Med Univ Niger Nsukka,V.15,(2006).
228. Une, Y., Mori, T., "Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective", *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*,V.30,n°5–6,(2007),415–25.
 229. Kleeberg, H.H., "Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health", *Rev sci tech Off int Epiz*,V.3,n°1,(1984),11–32.
 230. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hincheliff, K.W., "Disease caused by bacteria–*Mycobacterium*", *Vet Med A Text B Dis Cattle, Sheep, Pig, Goat Horses* 9th ed Harcourt Publ Ltd, London,V.72,(2000),909–18.
 231. LoBue, P. A., Betacourt, W., Peter, C., Moser, K. S., "Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994–2000", *Int J Tuberc Lung Dis*,V.7,n°2,(2003),180–5.
 232. Thoen, C., LoBue, P., De Kantor, I., "The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis", *Vet Microbiol*,V.112,n°2–4,(2006),339–45.
 233. Sa'idu, A.S., Okolocha, E.C., Dzikwi, A.A., Gamawa, A.A., Ibrahim, S., Kwaga, J.K.P, et al., "Public health implications and risk factors assessment of *Mycobacterium bovis* infections among abattoir personnel in Bauchi state, Nigeria",*J Vet Med*,(2015).
 234. Acha, P.N., Szyfres, B., "Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux: Parasitoses,V.3, (2005), (Zoonoses et maladies transmissibles à l'homme et aux animaux),Available from: <https://books.google.dz/books?id=Uu4lJwAACAAJ>
 235. Alcaïs, A., Abel, L., Casanova, J.L., "Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm", *J Clin Invest*,V.119,n°9, (2009),2506–14.
 236. Casanova, J.L., Abel, L., "The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations", *Annu Rev Genomics Hum Genet*, V.14,(2013), 215–43.
 237. Fox, G.J., Orlova, M., Schurr, E., "Tuberculosis in newborns: the lessons of the "Lübeck Disaster"(1929–1933)", *PLoS Pathog*,V.12,n°1,(2016),e1005271.
 238. van Tong, H., Velavan, T.P., Thye, T., Meyer, C.G., "Human genetic factors in tuberculosis: an update",*Trop Med Int Heal*,V.22,n°9,(2017),1063–71.
 239. Boisson-Dupuis, S., Bustamante, J., El-Baghdadi, J., Camcioglu ,Y.,

- Parvaneh, N., El Azbaoui, S., et al., "Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood", *Immunol Rev*, V.264,n°1,(2015),103–20.
240. Casanova, J.L., "Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity", *Proc Natl Acad Sci*, V.112,n°51,(2015)E7128–37.
241. Bogunovic, D., Byun, M., Durfee, L.A., Abhyankar, A., Sanal, O., Mansouri, D., et al., "Mycobacterial disease and impaired IFN- γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency", *Science (80-)*, V.337,n°6102,(2012),1684–8.
242. Bustamante, J., Arias, A.A., Vogt, G., Picard, C., Galicia, L.B., Prando, C., et al., "Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease", *Nat Immunol*, V.12,n°3,(2011),213–21.
243. Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., et al., "IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency", *N Engl J Med*, V.365,n°2,(2011),127–38.
244. Farrar, J., Hotez, P.J., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., White, N.J., "Manson's Tropical Diseases E-Book", Elsevier Health Sciences,(2013), Available from: <https://books.google.dz/books?id=GTjRAQAAQBAJ>
245. Corbett, E.L., Watt, C.J., Walker, N., Maher, D., Williams, B.G., Raviglione, M.C., et al., "The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic", *Arch Intern Med*, V.163,n°9,(2003),1009–21.
246. Bucher, H.C., Griffith, L.E., Guyatt, G.H., Sudre, P., Naef, M., Sendi, P., et al., "Isoniazid prophylaxis for tuberculosis in HIV infection: a meta-analysis of randomized controlled trials", *Aids*, V.13,n°4,(1999),501–7.
247. Sharma, S.K., Mohan, A., Kadhiravan, T. "HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis & management", *Indian J Med Res*, V.121,n°4,(2005),550–67.
248. Brosch, R., Che, D., Decludt, B., Durieux, P., Gaudelus, J., Gicquel, B., et al., "Tuberculose: place de la vaccination dans la maîtrise de la maladie", (2004).
249. Saunders, B.M., Britton W.J., "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis", *Immunol Cell Biol*, V.85,n°2,(2007),103–11.
250. Martinson, N.A., Hoffmann, C.J., Chaisson, R.E., "Epidemiology of tuberculosis and HIV: recent advances in understanding and responses",

- Proc Am Thorac Soc,V.8,n°3, (2011),288–93.
251. Raviglione, M., Sulis, G., "Tuberculosis 2015: burden, challenges and strategy for control and elimination", *Infect Dis Rep*,V.8,n°2,(2016).
 252. Organisation Mondiale de la Santé., "Global report on diabetes". Organisation mondiale de la Santé, 20 avenue Appia, 1211 Genève 27 (Suisse),(2016),Available from: apps.who.int/iris/bitstream/10665/254648/1/9789242565256-fre.pdf?ua=1
 253. Bashar, M., Alcabes, P., Rom, W.N., Condos, R., "Increased incidence of multidrug-resistant tuberculosis in diabetic patients on the Bellevue Chest Service, 1987 to 1997",*Chest*,V.120,n°5,(2011),1514–9.
 254. Workneh, M.H., Bjune, G.A., Yimer, S.A., "Prevalence and associated factors of tuberculosis and diabetes mellitus comorbidity: a systematic review", *PLoS One*,V.12,n°4,(2017),e0175925.
 255. Bates, M.N., Khalakdina, A., Pai, M., Chang, L., Lessa, F., Smith, K.R., "Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis", *Arch Intern Med*,V.167,n°4,(2007),335–42.
 256. van Zyl Smit, R.N., Pai, M., Yew, W.W., Leung, CC., Zumla, A., Bateman, E.D., et al., "Global lung health: the colliding epidemics of tuberculosis, tobacco smoking, HIV and COPD",*Eur Respir J*,V.35,n°1,(2010),27–33.
 257. Lönnroth, K., Williams, B.G., Stadlin, S., Jaramillo, E., Dye, C., "Alcohol use as a risk factor for tuberculosis—a systematic review",*BMC Public Health*, V.8,n°1,(2008),289.
 258. Szabo, G., "Alcohol's contribution to compromised immunity",*Alcohol Health Res World*,V.21,n°1,(1997),30.
 259. Vayr, F., Martin-Blondel, G., Savall, F., Soulat, J.M, Deffontaines, G., Herin, F., "Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic review",*PLoS Negl Trop Dis*,V.12,n°1,(2018),e0006208.
 260. Rodríguez, E., Sánchez, L.P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M.S., Samper, S., et al., "Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007",*Int J Tuberc Lung Dis*,V.13,n°12,(2009),1536–41.
 261. Kohler, W., "Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans", *Int J Med Microbiol*,V.293,n°7/8, (2004),548.
 262. Lönnroth, K., Jaramillo, E., Williams, B.G., Dye, C., Raviglione, M., "Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants", *Soc*

- Sci Med,V.68,n°12, (2009),2240–6.
263. Muniyandi, M., Ramachandran, R., Gopi, P.G., Chandrasekaran, V., Subramani, R., Sadacharam, K., et al., "The prevalence of tuberculosis in different economic strata: a community survey from South India", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.11,n°9,(2007),1042–5.
 264. Lonnroth, K., Zignol, M., Uplekar, M., "Controlling tuberculosis in large metropolitan settings", *LUNG Biol Heal Dis*, V.219,(2006),1005.
 265. Kjellstrom, T., Mercado, S., Barten, F., Ompad D., "Our cities, our health, our future: acting on social determinants for health equity in urban settings: report to the WHO Commission on Social Determinants of Health from the Knowledge Network on Urban Settings", (2007).
 266. O'grady, J., Maeurer, M., Atun, R., Abubakar, I., Mwaba, P., Bates, M., et al., "Tuberculosis in prisons: anatomy of global neglect", *Eur Respiratory Soc*, (2011).
 267. Bobrik ,A., Danishevski, K., Eroshina, K., McKee, M., "Prison health in Russia: the larger picture", *J Public Health Policy*, V.26,n°1,(2005),30–59.
 268. Menzies, D., Joshi, R., Pai, M., "Risk of tuberculosis infection and disease associated with work in health care settings [State of the Art Series. Occupational lung disease in high-and low-income countries", Edited by M. Chan-Yeung. Number 5 in the series]. *Int J Tuberc Lung Dis*, V.11,n°6,(2007),593–605.
 269. Mishra, V.K., Retherford, R.D., Smith, K.R., "Biomass cooking fuels and prevalence of tuberculosis in India", *Int J Infect Dis*, V.3,n°3,(1999),119–29.
 270. Perez-Padilla, R., Perez-Guzman, C., Baez-Saldana, R., Torres-Cruz, A., "Cooking with biomass stoves and tuberculosis: a case control study", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.5,n°5,(2001),441–7.
 271. Pokhrel, A.K., Bates, M.N., Verma, S.C., Joshi, H.S., Sreeramareddy, C.T., Smith, K.R., "Tuberculosis and indoor biomass and kerosene use in Nepal: a case–control study", *Environ Health Perspect*, V.118,n°4,(2010),558–64.
 272. Fick, J.r .R.B., Paul, E.S., Merrill, W.W., Reynolds, H.Y., Loke, J.S.O., "Alterations in the antibacterial properties of rabbit pulmonary macrophages exposed to wood smoke", *Am Rev Respir Dis*, V.129,n°1,(1984),76–81.
 273. Boman, B.C., Forsberg, A.B., Järholm ,B.G., "Adverse health effects from ambient air pollution in relation to residential wood combustion in modern

- society", *Scand J Work Environ Health*, (2003), 251–60.
274. Bruce, N., Perez-Padilla, R., Albalak, R., "Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge", *Bull World Health Organ*, V.78, (2000), 1078–92.
 275. Ezzati, M., Kammen, D.M., "The health impacts of exposure to indoor air pollution from solid fuels in developing countries: knowledge, gaps, and data needs", *Environ Health Perspect*, V.110, n°11, (2002), 1057–68.
 276. Dean, G.S., Rhodes, S.G., Coad, M., Whelan, A.O., Cockle, P.J., Clifford, D.J., et al., "Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle", *Infect Immun*, V.73, n°10, (2005), 6467–71.
 277. Johnson, L., Dean G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A., "Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection", *Tuberculosis*, V.87, n°1, (2007), 71–6.
 278. Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R., "The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle", *Res Vet Sci*, V.74, n°1, (2003), 1–15.
 279. O'Reilly, L.M., Daborn, C.J., "The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review", *Tuber Lung Dis*, V.76, (1995), 1–46.
 280. Delafosse, A., Goutard, F., Thebaud, E., "Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abéché, Tchad", (2002).
 281. Inangolet, F.O., Demelash, B., Oloya, J., Opuda-Asibo, J., Skjerve, E., "A cross-sectional study of bovine tuberculosis in the transhumant and agro-pastoral cattle herds in the border areas of Katakwi and Moroto districts, Uganda", *Trop Anim Health Prod*, V.40, n°7, (2008), 501–8.
 282. Kazwala, R.R., Kambarage, D.M., Daborn, C.J., Nyange, J., Jiwa, S.F.H., Sharp, J.M., "Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania", *Vet Res Commun*, V.25, n°8, (2001), 609–14.
 283. Broughan J.M., Judge J., Ely E., Delahay R.J., Wilson G., Clifton-Hadley R.S., et al., "A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland", *Epidemiol Infect*, V.144, n°14, (2016), 2899–926.
 284. Brooks-Pollock, E., Conlan, A.J.K., Mitchell A.P., Blackwell, R., McKinley, T.J., Wood J.L.N., "Age-dependent patterns of bovine tuberculosis in cattle",

- Vet Res,V.44,n°1,(2013),97.
285. 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 Int Des Epizoot*,V.23,n°3,(2004),957–64.
 286. Fikru, R., Bonnet, P., Moges, W., "Prevalence of bovine tuberculosis in indigenous Zebu cattle under extensive farming system in Western Ethiopia", *Bull Anim Heal Prod Africa*,V.53,n°1,(2005),85–8.
 287. Wood, P.R., Jones, S.L., "BOVIGAMTM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis", *Tuberculosis*,V.81,n°1–2,(2001),147–55.
 288. Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W.J., Branch, B., "Bovine tuberculosis (TB): a review of cattle-to-cattle transmission, risk factors and susceptibility", *Bacteriol Branch Vet Sci Div Agrifood Biosci Inst*,(2011).
 289. ACEVEDO-WHITEHOUSE, K., Vicente, J., Gortazar, C., Hoefle, U., FERNÁNDEZ-DE-MERA, I.G., Amos, W., "Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar", *Mol Ecol*,V.14,n°10,(2005),3209–17.
 290. Brotherstone, S., White, I.M.S., Coffey, M., Downs, S.H., Mitchell, A.P., Clifton-Hadley, R.S., et al., "Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*", *J Dairy Sci*,V.93,n°3,(2010),1234–42.
 291. Mackintosh, C.G., Qureshi, T., Waldrup, K., Labes, R.E., Dodds, K.G., Griffin, J.F.T., "Genetic resistance to experimental infection with *Mycobacterium bovis* in red deer (*Cervus elaphus*)", *Infect Immun*, V.68,n°3,(2000),1620–5.
 292. Bermingham, M.L., Bishop, S.C., Woolliams, J.A., Pong-Wong, R., Allen, A.R., McBride, S.H., et al., "Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis", *Heredity (Edinb)*, V.112,n°5,(2014),543–51.
 293. Palisson, A., Courcoul, A., Durand, B., "Role of cattle movements in bovine tuberculosis spread in France between 2005 and 2014", *PLoS One*, V.11,n°3,(2016),e0152578.
 294. Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W.J., "Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review", *Vet Med Int*,(2012).
 295. Marsot, M., Durand, B., Scoizec, A., Béral, M., Mathevon, Y., Courcoul, A., "Facteurs de risque de tuberculose bovine—une étude cas-témoins dans trois départements français (Ardennes, Côte d’Ord et Dordogne)", *Bull Epid Santé*

- Anim Alim,V.74,(2016),8–11.
296. Courcoul, A., Moutou, F., Vialard, J., "Tuberculose bovine: investigations épidémiologiques au sein de troupeaux bovins infectés à plusieurs reprises", Bull Epid Santé Anim Alim,V.56,(2013),10–4.
 297. Griffin, J.M., Martin, S.W., Thorburn, M.A., Eves, J.A., Hammond, R.F.," A case-control study on the association of selected risk factors with the occurrence of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland", Prev Vet Med, V.27,n°1–2,(1996),75–87.
 298. Waters, W.R., Maggioli, M.F., McGill, J.L., Lyashchenko, K.P., Palmer, M .V., "Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms", Vet Immunol Immunopathol,V.159,n°3–4,(2014),113–32.
 299. Beauvillain, C., Jeannin, P., Renier, G., Chevaller, A., "Apport des tests de quantification de la libération d'interféron gamma par les lymphocytes T sensibilisés pour le diagnostic des infections tuberculeuses", Rev Francoph des Lab,V.2009,n°410,(2009),33–41.
 300. Acha P.N., Szyfres, B., "Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux: *Chlamydioses, rickettsioses et viroses* ",OIE,V.2,(2005).
 301. Domingo, M., Vidal, E., Marco, A., "Pathology of bovine tuberculosis", Res Vet Sci,V.97,(2014),S20–9.
 302. Arriaga, A.K., Orozco, E.H., Aguilar, L.D., Rook, G.A.W., Pando, R.H., "Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis",Clin Exp Immunol,V.128,n°2,(2002),229–37.
 303. Ketata, W., Rekik, W.K., Ayadi, H., Kammoun, S., "Les tuberculoses extrapulmonaires", Rev Pneumol Clin,V.71,n°2–3,(2015),83–92.
 304. Udwadia, Z.F, Sen, T., "Pleural tuberculosis: an update",Curr Opin Pulm Med,V.16,n°4,(2010),399–406.
 305. Thwaites, G.E., Hien, T.T., "Tuberculous meningitis: many questions, too few answers", Lancet Neurol,V.4,n°3,(2005),160–70.
 306. Trautner, B.W., Darouiche, R.O., "Tuberculous pericarditis: optimal diagnosis and management", Clin Infect Dis,V.33,n°7,(2001),954–61.
 307. Cutrufello, N.J., Karakousis, P.C., Fishler, J., Albin, T.A., "Intraocular

- tuberculosis", *Ocul Immunol Inflamm*, V.18,n°4,(2010),281–91.
308. Dunn, J.J., Starke, J.R., Revell, P.A., "Laboratory diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in children", *J Clin Microbiol*, V.54,n°6,(2016),1434–41.
309. Delacourt, C., "Particularités de la tuberculose chez l'enfant", *Rev Mal Respir*, V.284,(2011),529–41.
- 310 Acha P.N.,and Szyfres,B., "*Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux*", V610.2005.
311. College, P.S., "Report", (1895). Available from: <https://books.google.dz/books?id=H0s1AQAAMAAJ>
312. Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W., "Veterinary Reproduction and Obstetrics", Elsevier, chapitre 24, (2018). Available from: <https://books.google.dz/books?id=akhYswEACAAJ>
313. Biolatti, B., Pau, S., Galloni, M., "The epithelial pathology of bovine genital tuberculosis", *J Comp Pathol*. 1989;V.100,n°2, (1989),137–44.
314. Klotoe, J.B.M., " Développement de méthodes pour le diagnostic, le contrôle, la surveillance de la tuberculose à bacilles ultra-résistants et des souches épidémiques Beijing", (2018).
315. Krauss, H., Enders, B., Weber, A., Schieffer, H.G., Appel, M., Zahner, H., "Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans", ASM Press,(2003),Available from: <https://books.google.dz/books?id=bpZrAAAAMAAJ>
316. Kuria, J.N., Gathogo S.M., "Concomitant fungal and *Mycobacterium bovis* infections in beef cattle in Kenya", *Onderstepoort J Vet Res*, V.80,n°1(2013),1–4.
317. Ramos, D.F., Silva, P.E.A, Dellagostin, O.A., "Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques", *Brazilian J Biol*,(2015).
318. Ryu, Y.J., "Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms", *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, V.78,n°2,(2015),64–71.
319. Carette, M.F., Mizouni, L., El Amri, A., Korzek, J., Khalil, A., "Imagerie typique et atypique de la tuberculose bronchopulmonaire", *La Lett du Pneumol*, V.15,n°1–2,(2012),32–45.
320. Moyen, J.L., Brugère, L., Faye, S., Boschioli, M.L., "Utilisation de la PCR pour

- le diagnostic de la tuberculose bovine", *Le Point Vétérinaire*, V.312,(2011),68–72.
321. Watrelot-Virieux, D., Drevon-Gaillot, E., Toussaint, Y., Belli P., "Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle", *J Vet Med Ser B*,V.53,n°7,(2006),321–5.
 322. Small, P.M, Pai, M., "Tuberculosis diagnosis—time for a game change", *Mass Medical Soc*,(2010).
 323. Desikan, P., "Sputum smear microscopy in tuberculosis: is it still relevant?", *Indian J Med Res*,V.137,n°3,(2013),442.
 324. Mase, S.R., Ramsay, A., Ng ,V., Henry, M., Hopewell, P.C., Cunningham ,J., et al., "Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.11,n°5,(2007),485–95.
 325. Steingart, K.R., Henry, M., Ng, V., Hopewell ,P.C., Ramsay, A., Cunningham, J., et al., "Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review", *Lancet Infect Dis*, V.6,n°9,(2006),570–81.
 326. Jabri, H., Lakhdar, N., El Khattabi, W., Afif ,H., "Les moyens diagnostiques de la tuberculose", *Rev Pneumol Clin*,V.72,n°5,(2016),320–5.
 327. Donato, L., "Tuberculose", *Pneumologie pédiatrique*,Elsevier,(2011),105–36.
 328. Carbonnelle, B., Carpentier, E., "Diagnostic bactériologique de la tuberculose: hiérarchisation actuelle des méthodes",*La Rev médecine interne*,V.16,n°7,(1995),518–23.
 329. Parsons, L.M., Somoskövi, Á., Gutierrez, C., Lee, E., Paramasivan, C.N., Abimiku, A., et al., "Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities",*Clin Microbiol Rev*,V.24,n°2,(2011),314–50.
 330. World Health Organization., "Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement", (2011).
 331. Mason, R.J., Slutsky, A., Murray, J.F., Nadel, J.A., Gotway, M.B., Broaddus, V.C., et al., "Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine E-Book, Elsevier Health Sciences, (2015), Available from: <https://books.google.dz/books?id=Hux1BwAAQBAJ>
 332. Grosset ,J., "Place des examens microbiologiques et anatomopathologiques dans la décision diagnostique et thérapeutique", *Médecine Mal Infect*,

- V.25,n°3,(1995),327–33.
333. Garg, R.K., Rizvi, I., Malhotra, H.S., Uniyal, R., Kumar, N., "Management of complex tuberculosis cases: a focus on drug-resistant tuberculous meningitis", *Expert Rev Anti Infect Ther*,V.16n°11,(2018),813–31.
 334. Parrish, N.M., Carroll, K.C., "Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings", *J Clin Microbiol*,V.49,n°3,(2011),772–6.
 335. Della, L.P., "Mycobacteriology and mycobacterial susceptibility tests", *Clin Microbiol Proced Handb*,V.2,(2004).
 336. Chaudhary, S.K., "Comparison of hypertonic saline–sodium hydroxide decontamination method with modified petroff's method for concentrating sputum samples",(2010).
 337. Zingué, D., Hien, H., Méda, N., Zida, S., Kaboré, A., Sanou, A., et al., "Avantages et limites des méthodes de décontamination des expectorations pour le diagnostic de la tuberculose et des résistances aux antituberculeux", In: *Annales de Biologie Clinique*,(2013),283–91.
 338. Kent, P.T., "Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory", US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers,(1985).
 339. Yajko, D.M., Nassos, P.S., Sanders, C.A., Gonzalez, P.C., Reingold, A.L., Horsburgh, C.R., et al., "Comparison of four decontamination methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from stools", *J Clin Microbiol*, V.31,n°2,(1993),302–6.
 340. Ricaldi, J.N, Guerra, H., "A simple and improved method for diagnosis of tuberculosis using hypertonic saline and sodium hydroxide to concentrate and decontaminate sputum", *Trop Doct*,V.38,n°2,(2008),97–9.
 341. Ferroni, A., Vu-Thien, H., Lanotte, P., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Fauroux, B., et al., "Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis", *J Clin Microbiol*,V.44,n°6,(2006),2237–9.
 342. Ambrosio, S.R., Oliveira, E.M de D., Rodriguez, C.A.R., Ferreira Neto, J.S., Amaku, M., "Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation", *Brazilian J Microbiol*,V.39,n°2,(2008),241–4.
 343. Buijtels, P.C.A.M., Petit, P.L.C., " Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and

- sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens", *J Microbiol Methods*, V.62,n°1,(2005),83–8.
344. Smithwick, R.W., Stratigos, C.B., David, H.L., "Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*", *J Clin Microbiol*, V.1,n°5,(1975),411–3.
345. Rivas, C., Coitinho, C., Dafond, V., Corbo, M., Baldjian M., "Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload", *Rev Argent Microbiol*, V.42,n°2,(2010),87–90.
346. Jaspe, R.C., Rojas, Y.M., Flores, L.A., Sofia Toro, E., Takiff, H., De Waard, J.H., "Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas", *Trop Med Int Heal*, V.14,n°4,(2009),468–71.
347. Metchock, B.G., Nolte, F.S., WALLACE, J.R J.W., Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., et al., "*Mycobacterium* In Manual of clinical microbiology", Am Soc Microbiol Press Washington,(1995),400–37.
348. Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R., "Bactériologie Médicale Techniques Usuelles", Ed Masson,(2007).
349. Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., "Bactériologie clinique", Ellipses Edition Marketing SA,(2000).
350. Coletsos, P.J., "Milieu et modalités de culture adaptés à la réanimation et à la multiplication in vitro de *Mycobacterium tuberculosis* de vitalité réduite de viabilité éphémère ou en état de quiescence", *Ann Inst Pasteur*, V.99,(1960),475–95.
351. Asmar, S., Drancourt, M., "Rapid culture-based diagnosis of pulmonary tuberculosis in developed and developing countries", *Front Microbiol*, V.6,(2015),1184.
352. Procop, G.W., "Laboratory diagnosis and susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*", *Tuberc Nontuberculous Mycobact Infect*, (2017),45–58.
353. Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham, J.O., Hruska, K., "The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health", Springer Netherlands,(2010), Available from: https://books.google.dz/books?id=d_xinfzC9o0C

354. Gravet, A., Souillard, N., Habermacher, J., Moser, A., Lohmann, C., Schmitt, F., et al., "La culture et l'antibiogramme de mycobactéries sur automate VersaTREK", *Pathol Biol*, V.59, n°1, (2011), 32–8.
355. Dubos, R.J., Fenner, F., Pierce C., "Properties of a culture of BCG grown in liquid media containing Tween 80 and the filtrate of heated serum", *Am Rev Tuberc*, V.61, n°1, (1950), 66–76.
356. Whitelaw, A.C, Sturm, W.A., "Microbiological testing for *Mycobacterium tuberculosis*", In: *Tuberculosis*, Elsevier, (2009), 169–78.
357. Kubica, G.P., Pool, G.L., "Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli: I. An attempt to subgroup these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH", *Am Rev Respir Dis*, V.81, n°3, (1960), 387–91.
358. Giampaglia, C.M.S., Martins, M.C., Inumaru, V.T.G., Butuem, I. V., Telles, M.A.S., "Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with p-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.9, n°2, (2005), 206–9.
359. Kumar, V.G.S., Urs, T.A., Ranganath, R.R., "MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of *M. tuberculosis* isolates", *BMC Res Notes*, V.4, n°1, (2011), 1–4.
360. Lawn, S.D., Kerkhoff, A.D., Vogt, M., Wood, R., "Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study", *Lancet Infect Dis*, V.12, n°3, (2012), 201–9.
361. Ramos, L.S., "Characterization of mycobacteria species by HPLC and pattern recognition", *J Chromatogr Sci*, V.32, n°6, (1994), 219–27.
362. LaBombardi, V.J., Katariwala, R., Pipia, G., "The identification of mycobacteria from solid media and directly from VersaTREK Myco bottles using the Sherlock Mycobacteria Identification HPLC system", *Clin Microbiol Infect*, V.12, n°5, (2006), 478–81.
363. Zhang, J., Abadia, E., Refregier, G., Tafaj, S., Boschiroli, M.L., Guillard, B., et al., "*Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay", *J Med*

- Microbiol,V.59,n°3,(2010),285–94.
364. Hettick, J.M., Kashon, M.L., Simpson, J.P., Siegel, P.D., Mazurek, G.H., Weissman, D.N., "Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry",*Anal Chem*,V.76,n°19,(2004),5769–76.
365. Pignone, M., Greth, K.M., Cooper, J., Emerson, D., Tang, J., "Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry",*J Clin Microbiol*,V.44,n°6,(2006),1963–70.
366. Lotz, A., Ferroni, A., Beretti, J.L, Dauphin, B., Carbonnelle, E., Guet-Revillet, H., et al., "Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry",*J Clin Microbiol*,V.48,n°12,(2010),4481–6.
367. Bouakaze, C., Keyser, C., Gonzalez, A., Sougakoff, W., Veziris, N., Dabernat, H., et al., "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based single nucleotide polymorphism genotyping assay using iPLEX gold technology for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species and lineages",*J Clin Microbiol*,V.49,n°9,(2011),3292–9.
368. Neonakis, I.K., Gitti, Z., Krambovitis, E., Spandidos, D.A., "Molecular diagnostic tools in mycobacteriology",*J Microbiol Methods*,V.75,n°1,(2008),1–11.
369. Sjöbring, U., Mecklenburg, M., Andersen, A.B., Miörner, H., "Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*", *J Clin Microbiol*,V.28,n°10,(1990),2200–4.
370. Moore, D.F., Curry, J.I., "Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction",*J Clin Microbiol*,V.36,n°4,(1998),1028–31.
371. Kirschner, P., Rosenau, J., Springer, B., Teschner, K., Feldmann, K., Böttger, E.C., "Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study",*J Clin Microbiol*,V.34,n°2,(1996),304–12.
372. Richter, E., Weizenegger, M., Rüscher-Gerdes, S., Niemann, S., "Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates", *J Clin Microbiol*,V.41,n°6,(2003),2672–5.
373. Gitti, Z., Neonakis, I., Fanti, G., Kontos, F., Maraki, S., Tselentis, Y., "Use of the GenoType *Mycobacterium* CM and AS assays to analyze 76

- nontuberculous mycobacterial isolates from Greece", *J Clin Microbiol*, V.44, n°6, (2006), 2244–6.
374. Kato-Maeda, M., Rhee, J.T., Gingeras, T.R., Salamon, H., Drenkow, J., Smittipat, N., et al., "Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*", *Genome Res*, V.11, n°4, (2001), 547–54.
375. Burgos, M .V., Pym, A.S., "Molecular epidemiology of tuberculosis", *Eur Respir J*, V.20, n°36, (2002), 54s-65s.
376. Thierry, D., Brisson-Noël, A., Vincent-Lévy-Frébault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., Gicquel, B., " Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis", *J Clin Microbiol*, V.28, n°12, (1990), 2668–73.
377. Van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., et al., "Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology", *J Clin Microbiol*, V.31, n°2, (1993), 406–9.
378. Barlow, R.E.L., Gascoyne-Binzi, D.M., Gillespie, S.H., Dickens, A., Qamer, S., Hawkey, P.M., "Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high-and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates", *J Clin Microbiol*, V.39, n°7, (2001), 2453–7.
379. Jagielski, T., Van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J., Mazur, P.K., Bielecki, J., "Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria", *Biomed Res Int*, (2014).
380. Couvin, D., Rastogi, N., "La mise en place de bases de données des génotypes circulants du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et des outils web permettant de mieux surveiller, comprendre et contrôler l'épidémie de la tuberculose dans le monde), (2014).
381. Hermans, P.W., Van Soolingen, D., Bik, E.M., De Haas, P.E., Dale, J.W., Van Embden, J.D., "Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains", *Infect Immun*, V.59, n°8, (1991), 2695–705.
382. Skuce, R.A., Neill, S.D., " Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data", *Tuberculosis*, V.81, n°1–2, (2001), 169–75.

383. Ocheretina, O., Merveille, Y.M., Mabou, M.M., Escuyer, V.E., Dunbar, S.A., Johnson, W.D., et al., "Use of Luminex MagPlex magnetic microspheres for high-throughput spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Port-au-Prince, Haiti", *J Clin Microbiol*, V.51, n°7, (2013), 2232–7.
384. Honisch, C., Mosko, M., Arnold, C., Gharbia, S.E., Diel, R., Niemann, S., "Replacing reverse line blot hybridization spoligotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, V.48, n°5, (2010), 1520–6.
385. Dale, J.W., Brittain, D., Cataldi, A.A., Cousins, D., Crawford, J.T., Driscoll, J., et al., "Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature [The Language of Our Science]", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.5, n°3, (2001), 216–9.
386. Jagielski, T., Minias, A., Van Ingen, J., Rastogi, N., Brzostek, A., Żaczek, A., et al., "Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria", *Clin Microbiol Rev*. V.29, n°2, (2016), 239–90.
387. Vincent, V., Gutierrez, M.C., "Apport épidémiologique du typage moléculaire des bacilles de la tuberculose", *Médecine Mal Infect*, V.33, (2003), 159–66.
388. Van Soolingen, D., "Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements", *J Intern Med*, V.249, n°1, (2001), 1–26.
389. Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W., Gori, A., Cafrune, P., et al., "*Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity", *Min fourth Int spoligotyping database Classif Popul Genet Epidemiol*, (2006), 6.
390. Van der Zanden, A.G., Hoentjen, A.H., Heilmann, F.G., Weltevreden, E.F., Schouls, L.M., Van Embden, J.D., "Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations", *Mol Pathol*, V.51, n°4, (1998), 209.
391. Driscoll, J.R., McGarry, M.A., Taber, H.W., "DNA typing of a nonviable culture of *Mycobacterium tuberculosis* in a homeless shelter outbreak", *J Clin Microbiol*, V.37, n°1, (1999), 274–5.
392. Kulkarni, S., Sola, C., Filliol, I., Rastogi, N., Kadival, G., "Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mumbai, India", *Res Microbiol*, V.156, n°4, (2005), 588–96.

393. Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Locht, C., Supply, P., et al., "Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics", *Infect Genet Evol*, V.3, n°2, (2003), 125–33.
394. Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsche-Gerdes, S., Willery, E., et al., "Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*", *J Clin Microbiol*, V.44, n°12, (2006), 4498–510.
395. Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A.L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., et al., "High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology", *Proc Natl Acad Sci*, V.98, n°4, (2001), 1901–6.
396. Cowan, L.S., Mosher, L., Diem, L., Massey, J.P., Crawford, J.T., "Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units", *J Clin Microbiol*, V.40, n°5, (2002), 1592–602.
397. Weniger, T., Krawczyk, J., Supply, P., Niemann, S., Harmsen, D., "MIRU-VNTR plus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria", *Nucleic Acids Res*, V.38, n°2, (2010), W326–31.
398. Allix-Béguet, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., Niemann, S., "Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates", *J Clin Microbiol*, V.46, n°8, (2008), 2692–9.
399. Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Van Soolingen, D., Locht, C., "Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units", *J Clin Microbiol*, V.39, n°10, (2001), 3563–71.
400. Navarro, Y., Romero, B., Bouza, E., Domínguez, L., de Juan, L., García-de-Viedma, D., "Detailed chronological analysis of microevolution events in herds infected persistently by *Mycobacterium bovis*", *Vet Microbiol*, V.183, (2016), 97–102.
401. Lekko, Y.M., Ooi, P.T., Omar, S., Mazlan, M., Ramanoon, S.Z., Jasni, S., et al., "*Mycobacterium tuberculosis* complex in wildlife: Review of current

- applications of antemortem and post-mortem diagnosis", *Vet world*, V.13,n°9,(2020),1822.
402. Niemann, S., Köser, C.U., Gagneux, S., Plinke, C., Homolka, S., Bignell, H., et al., "Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints", *PLoS One*, V.4,n°10,(2009),e7407.
 403. Baker, L., Brown, T., Maiden, M.C., Drobniowski, F., "Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*", *Emerg Infect Dis*, V.10,n°9,(2004),1568.
 404. Gutacker, M.M., Mathema, B., Soini, H., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N., Graviss, E.A., et al., "Single-nucleotide polymorphism–based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites", *J Infect Dis*, V.193,n°1,(2006),121–8.
 405. Stinear, T.P., Seemann, T., Pidot, S., Frigui, W., Reysset, G., Garnier, T., et al., "Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer", *Genome Res*, V.17,n°2,(2007),192–200.
 406. Cabibbe, A.M., Walker, T.M., Niemann, S., Cirillo, D.M., "Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*", *Eur Respir J*, V.52,n°5,(2018).
 407. Satta, G., Lipman, M., Smith, G.P, Arnold, C., Kon, O.M., McHugh, T.D., " *Mycobacterium tuberculosis* and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential?", *Clin Microbiol Infect*, V.24,n°6,(2018),604–9.
 408. Pepperell, C.S., Casto, A.M., Kitchen, A., Granka, J.M., Cornejo, O.E., Holmes, E.C., et al. "The role of selection in shaping diversity of natural *M. tuberculosis* populations", *PLoS Pathog*, V.9,n°8,(2013),e1003543.
 409. Coscolla, M., Gagneux, S., " Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity?" *Drug Discov Today Dis Mech*, V.7,n°1,(2010),e43–59.
 410. Trauner, A., Liu, Q., Via, L.E., Liu, X., Ruan, X., Liang, L., et al., "The within-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* vary with treatment efficacy", *Genome Biol*, V.18,n°1,(2017),1–17.
 411. Gardy J.L., Johnston J.C., Sui S.J.H., Cook V.J., Shah L., Brodtkin E., et al., "Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak", *N Engl J Med*, V.364,n°8,(2011),730–9.

412. Wlodarska, M., Johnston, J.C., Gardy, J.L., Tang, P., "A microbiological revolution meets an ancient disease: improving the management of tuberculosis with genomics", *Clin Microbiol Rev*, V.28, n°2, (2015), 523–39.
413. Guillet-Caruba, C., Martinez, V., Doucet-Populaire, F., "Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie", *La Rev médecine interne*, V.35, n°12, (2014), 794–800.
414. Edwards, L.B., Acquaviva, F.A., Livesay, V.T., "Identification of tuberculous infected: dual tests and density of reaction", *Am Rev Respir Dis*, V.108, n°6, (1973), 1334–9.
415. Nayak, S., Acharjya, B., "Mantoux test and its interpretation", *Indian Dermatol Online J*, V.3, n°1, (2012), 2.
416. Beydon, N., "Pneumologie pédiatrique: guide pratique", Elsevier Masson, (2012).
417. Mishra A., Singhal A., Chauhan D.S., Katoch V.M., Srivastava K., Thakral S.S., et al., "Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques", *J Clin Microbiol*, V.43, n°11, (2005), 5670–8.
418. De la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., "Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques", *Res Vet Sci*, V.81, n°2, (2006), 190–210.
419. Graham, S., Das Gupta, K., Hidvegi, R. J., Hanson, R., Kosiuk, J., Al Zahrani, K., et al., "Chest radiograph abnormalities associated with tuberculosis: reproducibility and yield of active cases", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.6, n°2, (2002), 137–42.
420. Wang, L., Turner, M.O., Elwood, R.K., Schulzer, M., FitzGerald, J.M., "A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements", *Thorax*, V.57, n°9, (2002), 804–9.
421. Rangaka, M.X., Wilkinson, K.A., Glynn, J.R., Ling, D., Menzies, D., Mwansa-Kambafwile, J., et al., "Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis", *Lancet Infect Dis*, V.12, n°1, (2012), 45–55.
422. Heym, B., Chinet, T., "Méthodes diagnostiques de l'infection tuberculeuse en

- 2007: intradermoréaction à la tuberculine ou interféron- γ ?", *La Rev médecine interne*, V.3, n°28, (2007), 147–50.
423. Sotgiu, G., Nahid, P., Loddenkemper, R., Abubakar, I., Miravitlles, M., Migliori, GB., "The ERS-endorsed official ATS/CDC/IDSA clinical practice guidelines on treatment of drug-susceptible tuberculosis", *Eur Respiratory Soc*, (2016).
424. Fitzgerald D.W., Sterline T.R., Haas D.W., "*Mycobacterium tuberculosis*", *Bennett's Princ Pract Infect Dis Elsevier Saunders*, (2015), 2787.
425. Tritar, F., Daghfous, H., Saad, S. Ben, Slim-Saidi, L., "Prise en charge de la tuberculose multirésistante", *Rev Pneumol Clin*, V.71, n°2–3, (2015), 130–9.
426. Amar, J Ben., Dhahri, B., Aouina, H., Azzabi, S., Baccar, M.A., El Gharbi, L., et al., "Traitement de la tuberculose", *Rev Pneumol Clin*, V.71, n°2–3, (2015), 122–9.
427. Yombi ,J.C., Olinga, U.N., "La tuberculose: épidémiologie, aspect clinique et traitement", *Louvain med*, V.134, n°10, (2015), 549–59.
428. World Health Organization (WHO)., "Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis policy. World Health Organization: Geneve, Switzerland, (2011), Available from: https://www.who.int/tb/publications/2011/led_microscopy_diagnosis_9789241501613/en/
429. Loch, C., "La tuberculose, une histoire toujours d'actualité" Éditions EDK, Groupe EDP Sciences, (2016).
430. Abouda M., Yangui F., Triki M., Kammoun H., Khouani H., Charfi MR., "Prévention de la tuberculose", *Rev Pneumol Clin*, V.71, n°2–3, (2015), 159–67.
431. Organisation Mondiale de la Santé., "Rapport sur la tuberculose dans le monde", (2019), Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2019_ExecutiveSummary_fr.pdf?ua=1
432. BAFAL L.C.B.S., "Les traitements antituberculeux et MDR: Expérience de l'Hôpital Moulay Youssef–CHU de Rabat", (2018).
433. Ohara, N., "Current status of tuberculosis and recombinant bacillus Calmette-Guérin vaccines", *J Oral Biosci*, V.54, n°2, (2012), 92–5.
434. Gong, W., Liang, Y., Wu, X., "The current status, challenges, and future developments of new tuberculosis vaccines", *Hum Vaccin Immunother*, V.14, n°7, (2018), 1697–716.

435. Achkar, J.M., Casadevall, A., "Antibody-mediated immunity against tuberculosis: implications for vaccine development", *Cell Host Microbe*,V.13,n°3,(2013),250–62.
436. Hussey, G., Hawkrigde, T., Hanekom, W., "Childhood tuberculosis: old and new vaccines",*Paediatr Respir Rev*,V.8,n°2,(2007),148–54.
437. Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A.S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., et al., "Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action", *Lancet Infect Dis*,V.17,n°1,(2017),e21–5.
438. Teppawar R.N., Chaudhari S.P., Moon S.L., Shinde S .V., Khan W.A., Patil A.R., "Zoonotic tuberculosis: a concern and strategies to combat" In: *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*, IntechOpen,(2018).
439. Lamine-Khemiri, H., Martínez, R., García-Jiménez, W.L., Benítez-Medina, J.M., Cortés, M., Hurtado, I., et al., "Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle of Tunisia", *Trop Anim Health Prod*, V.46,n°2,(2014),305–11.
440. Ejeh, E.F., Raji, M.A., Bello, M., Lawan, F.A., Francis, M.I., Kudi, A.C., et al. "Prevalence and direct economic losses from bovine tuberculosis in Makurdi, Nigeria", *Vet Med Int*,(2014).
441. Kasaye, S., Molla, W., Amini, G., "Prevalence of camel tuberculosis at Akaki abattoir in Addis Ababa, Ethiopia", *African J Microbiol Res*,V.7,n°20,(2013),2184–9.
442. Sidibé, S., Dicko, N.A., Fané, A., Doumbia, R.M., Sidibé, C.K., Kanté, S., et al., "Tuberculose bovine au Mali: résultats d'une enquête épidémiologique dans les élevages laitiers de la zone périurbaine du district de Bamako", *Rev d'élevage médecine vétérinaire des pays Trop*,V.56,n°3–4,(2003),115–20.
443. Palomino, J.C., Portaels, F., "Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system",*J Clin Microbiol*,V.36,n°2,(1998),402–8.
444. Cancino-Muñoz, I., Gil-Brusola, A., Torres-Puente, M., Mariner-Llicer, C., Dogba, J., Akinseye, V., et al., "Development and application of affordable SNP typing approaches to genotype *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in low and high burden countries", *Sci Rep*,V.9,n°1,(2019),1–12.

445. Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., De Kock, M., et al., "Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.10, n°7, (2006), 818–22.
446. Djemal, S.E., Siala, M., Smaoui, S., Kammoun, S., Marouane, C., Bezos, J., et al., "Genetic diversity assessment of Tunisian *Mycobacterium bovis* population isolated from cattle", *BMC Vet Res*, V.13, n°1, (2017), 393.
447. Boniotti, M.B., Gorla, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., et al., "Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping", *J Clin Microbiol*, V.47, n°3, (2009), 636–44.
448. Marianelli, C., Amato, B., Boniotti, M.B., Vitale, M., Ciarello, F.P., Pacciarini, M.L., et al., "Genotype diversity and distribution of *Mycobacterium bovis* from livestock in a small, high-risk area in northeastern Sicily, Italy", *PLoS Negl Trop Dis*, V.13, n°7, (2019), e0007546.
449. S RC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in Spain", University of Madrid, (2012) Available from: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjQ9ITAq83pAhUQxoUKHRjNCywQFjABegQIBB AB&url=https%3A%2F%2Fwww.visavet.es%2Fdata%2Ftesis%2Fmolecular-epidemiology-of-mycobacterium-bovis-and-mycobacterium-caprae-in-spa>
450. Hauer, A., De Cruz, K., Cochard, T., Godreuil, S., Karoui, C., Henault, S., et al., "Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978", *PLoS One*, V.10, n°2, (2015), e0117103.
451. Ghavidel, M., Mansury, D., Nourian, K., Ghazvini K., "The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; A systematic review", *Microb Pathog*, V.118, (2018), 310–5.
452. Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., De Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., et al., "High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe", *Vet Microbiol*, V.141, n°1–2, (2010), 89–95.

453. Loiseau, C., Menardo, F., Aseffa, A., Hailu, E., Gumi, B., Ameni, G., et al., "An African origin for *Mycobacterium bovis*", *Evol Med public Heal*, n°1, (2020), 49–59.
454. Ahmad, I., Kudi, C.A., Abdulkadir, A.I., Saidu, S.N.A., Chafe, U.M., Abdulmalik, Z., "Survey of bovine tuberculosis in Nigerian beef cattle", *Open Vet J*, V.8, n°4, (2018), 463–70.
455. Kuria, J.K.N., "Diseases Caused by Bacteria in Cattle: Tuberculosis", In: *Bacterial Cattle Diseases*, Intechopen, (2019).
456. Pesciaroli M., Alvarez J., Boniotti M.B., Cagiola M., Di Marco V., Marianelli C., et al., "Tuberculosis in domestic animal species", *Res Vet Sci*, V.97: (2014), S78–85.
457. Liébana, E., Aranaz, A., Francis, B., Cousins, D., "Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex", *J Clin Microbiol*, V.34, n°4, (1996), 933–8.
458. Panteix, G., Gutierrez, M.C., Boschioli, M.L., Rouviere, M., Plaidy, A., Pressac, D, et al., "Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France", *J Med Microbiol*, V.59, n°8, (2010), 984–9.
459. Michelet, L., de Cruz, K., Karoui, C., Hénault, S., Boschioli, M.L., " *microti* infection in a cow in France", *Microbiology*, V.59, (2017), 285–94.
460. Silva-Pereira, T.T., Ikuta, C.Y., Zimpel, C.K., Camargo, N.C.S, de Souza Filho, A.F., Neto, J.S.F., et al., "Genome sequencing of *Mycobacterium pinnipedii* strains: genetic characterization and evidence of superinfection in a South American sea lion (*Otaria flavescens*)", *BMC Genomics*, V.20, n°1, (2019), 1–13.
461. Comas, I., Homolka, S., Niemann, S., Gagneux, S., "Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies", *PLoS One*, V.4, n°11, (2009), e7815.
462. Mekonnen, D., Derby, A., Abeje, A., Shumet, A., Kassahun, Y., Nibret, E., et al., "Genomic diversity and transmission dynamics of *M. tuberculosis* in Africa: a systematic review and meta-analysis", *Int J Tuberc Lung Dis*, V.23, n°12, (2019), 1314–26.
463. Kazwala, R.R., Daborn., C.J., Sharp, J.M., Kambarage, D.M, Jiwa, S.F.H., Mbembati, N.A., "Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of

- cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern?" *Int J Tuberc Lung Dis*, V.5,n°1,(2001),87–91.
464. Kidane, D., Olobo, J.O., Habte, A., Negesse, Y., Aseffa, A., Abate, G., et al., "Identification of the causative organism of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia by PCR", *J Clin Microbiol*, V.40,n°11,(2002),4230–4.
465. Siala, M., Cassan, C., Smaoui, S., Kammoun, S., Marouane, C., Godreuil, S., et al., "A first insight into genetic diversity of *Mycobacterium bovis* isolated from extrapulmonary tuberculosis patients in South Tunisia assessed by spoligotyping and MIRU VNTR", *PLoS Negl Trop Dis*, V.13,n°9,(2019),e0007707.
466. Fox, G.J., Barry, S.E., Britton, W.J., Marks, G.B., "Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis", *Eur Respir J*, V.41,n°1,(2013),140–56.
467. Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., et al., "The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*", *Proc Natl Acad Sci*, V.100,n°13,(2003),7877–82.
468. Senghore, M., Diarra, B., Gehre, F., Out, J., Worwui, A., Muhammad ,A.K., et al., "Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages and their role in an emerging threat of multidrug resistant tuberculosis in Bamako, Mali", *Sci Rep*, V.10,n°1,(2020),1–9.
469. Chihota V.N., Niehaus A., Streicher E.M., Wang X., Sampson S.L., Mason P., et al., "Geospatial distribution of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Africa", *PLoS One*, V.13,n°8,(2018),e0200632.
470. Namouchi, A., Karboul, A., Mhenni, B., Khabouchi, N., Haltiti, R., Hassine, R. Ben., et al., "Genetic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* in Tunisia: predominance and evidence for the establishment of a few genotypes", *J Med Microbiol*, V.57,n°7,(2008),864–72.
471. Chaoui, I., Zozio, T., Lahlou, O., Sabouni, R., Abid, M., El Aouad, R., et al., "Contribution of spoligotyping and MIRU-VNTRs to characterize prevalent *Mycobacterium tuberculosis* genotypes infecting tuberculosis patients in Morocco", *Infect Genet Evol*, V.21,(2014),463–71.
472. Togo, A.C.G., Kodio, O., Diarra, B., Sanogo, M., Coulibaly, G., Bane, S., et al., "The most frequent *Mycobacterium tuberculosis* complex families in mali (2006–2016) based on spoligotyping", *Int J*

mycobacteriology,V.6,n°4,(2017),379.

473. Mardassi, H., Namouchi, A., Haltiti, R., Zarrouk ,M., Mhenni, B., Karboul, A., et al., "Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia", *Emerg Infect Dis*,V.11,n°6,(2005),957.