

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb – Blida 1 –



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'Etudes

En Vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Génétique

THEME

Etude in silico de la variabilité génétique du gène de la résistance à la rifampicine rpoB chez *Mycobacterium bovis* isolé en Algérie et étude phylogénétique basée sur le gène PGRS26

Présenté par : Abismail Yacine et Bahloul Achouak

Devant le jury composé de :

- | | | |
|-----------------|-----------|--------------|
| • Dr Zerouti | MCA/USDB1 | Présidente |
| • Dr Benhouna | MCB/USDB1 | Examinatrice |
| • Dr Ammali N. | USDB1 | Promotrice |
| • Pr Guetarni D | Pr/USDB1 | Co-promoteur |

Année universitaire 2024-2025

Remerciement

Ce travail est le fruit de la combinaison d'efforts de plusieurs personnes. On remercie tout d'abord le tout puissant qui, par sa grâce nous a permis d'arriver au bout de nos efforts en nous donnant la santé, la force, le courage et en nous faisant entourer des merveilleuses personnes dont on tient à remercier :

***Mme Ammali**, notre promotrice, pour sa disponibilité, son encadrement rigoureux et ses précieux conseils tout au long de ce travail. Son accompagnement bienveillant a été d'une aide inestimable.*

***Monsieur Guetarni** pour ses efforts, son soutien constant et ses orientations précieuses tout au long de ce travail. Sa disponibilité et son écoute ont été d'un grand réconfort. Nos remerciements vont également à **Monsieur Mohammed Saïd**, notre chef d'option, pour ses conseils avisés et enrichissants qu'il nous a généreusement prodigués.*

*Nous saisissons cette occasion pour adresser nos sincères remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer notre travail. Nous remercions tout particulièrement Madame **Zerouti** pour avoir accepté de présider ce jury, ainsi que Madame **Benhoua** pour avoir bien voulu en être l'examinatrice. Nous comptons sur vos remarques, que nous savons enrichissantes, pour améliorer notre travail.*

Et à toutes ces personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire, je dis un grand merci.

Dédicace

Je tiens à dédier ce mémoire avec tout mon cœur au Bon Dieu, dont la présence m'a guidé et soutenu dans chaque étape de ce parcours parfois difficile.

À mes parents, dont l'amour inconditionnel et les sacrifices silencieux ont été ma plus grande source de motivation, ainsi qu'à mes sœurs, qui ont toujours su m'apporter réconfort et encouragements.

À mon amie d'enfance Asma, je veux exprimer une gratitude toute particulière : depuis nos premiers pas ensemble, elle a été pour moi un véritable refuge, partageant joies, peines et rêves, son amitié sincère et fidèle a été un pilier essentiel qui m'a soutenu dans les moments de doute et d'effort.

Quant à Salma et Maroua mes amies les plus proches à l'université, leur soutien, leur écoute et leur complicité ont été indispensables pour traverser les défis académiques et personnels. Un immense merci à mon collègue Yacine avec qui, ensemble, nous avons mené ce travail avec rigueur, rendant ce parcours encore plus enrichissant.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, leur aide a été inestimable.

Achouak,

Dédicace

Je tiens à dédier ce travail, fruit de mois de recherches et d'efforts, avant tout à Dieu, source de toute lumière et de tout savoir, qui m'a guidé et soutenu à chaque étape de ce parcours.

À mes chers parents, dont l'amour inconditionnel, les sacrifices quotidiens et la confiance indéfectible m'ont permis de persévérer dans les moments de doute ; votre exemple de courage et de dévouement reste ma plus grande source d'inspiration.

À Madame Ammali N, promotrice de ce projet, pour sa bienveillance, sa rigueur scientifique et ses conseils éclairés, qui ont orienté mes réflexions et enrichi la qualité de ce mémoire. Votre disponibilité et votre exigence m'ont poussé à donner le meilleur de moi-même.

À ma famille frères et sœurs, grands-parents , pour leur soutien moral et leurs encouragements constants, qui m'ont rappelé l'importance de la persévérance et de la solidarité.

À mes amis, pour les moments de détente partagés, les rires et les échanges stimulants, qui ont su alléger la pression des échéances et renforcer ma motivation.

Enfin, à mes collègues de l'université, pour l'entraide, pour leur entraide quotidienne, leurs encouragements.

À vous tous, j'adresse ma profonde gratitude ; sans votre présence et votre soutien, ce projet n'aurait pu voir le jour.

Yacine

Résumé :

Dans la présente étude, nous rapportons une analyse *in silico* portant sur les séquences de souches de *Mycobacterium bovis* isolées de bovins en Algérie, obtenues par Tazerart et al. (2021), où ils ont réalisé le séquençage complet du génome (WGS) de souches locales.

La variabilité génétique du gène *rpoB* responsable de la résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium bovis* a été analysée en comparant les souches isolées de bovins en Algérie avec des souches zoonotiques afin de mieux comprendre les mécanismes de la résistance à la rifampicine. L'étude phylogénétique des souches MTB a également été réalisée en se basant sur l'analyse du gène *PGRS26* codant pour une protéine antigénique. L'étude du gène *rpoB* était basée sur les séquences génomiques, disponibles sur la base de données NCBI GenBank, qui ont été collectées pour effectuer un alignement multiple au moyen du logiciel BioEdit et visualisée par JalView. Ces séquences ont été comparées à d'autres isolats issus de différentes régions du monde, provenant aussi bien de bovins que de l'Homme. L'approche phylogénétique par l'analyse du gène *PGRS26* était réalisée avec des séquences collectées de la même base de données, curées et alignées avec le site Phylogeny.fr et enfin l'analyse phylogénétique par le logiciel MEGA11.

L'analyse des séquences du gène *rpoB* chez les souches locales a révélé une forte homologie avec celles d'isolats provenant de différentes régions géographiques isolées chez les bovins, témoignant d'une conservation génétique marquée. En revanche, la comparaison avec les souches zoonotiques de *M. bovis* a mis en évidence une variabilité génétique, notamment au niveau de la région déterminante de la résistance à la rifampicine (RRDR).

Le premier arbre phylogénétique basé sur le gène *PGRS26* des souches *M. bovis* a permis d'évaluer la diversité génétique des souches algériennes comparées à des isolats du monde. Deux clades principaux ont été identifiés et les souches locales montrent une stabilité génétique notable avec une distance patristique de 9.15×10^{-3} par rapport à la souche de référence, sauf la souche CSURQ1134, qui était à une distance de 2.734×10^{-3} . Le deuxième arbre phylogénétique incluant les souches du complexe MTB révèle une divergence génétique entre ces espèces tout en mettant en exergue un clade ancestral conservé $\{M. tuberculosis, M. caprae, M. orygis \text{ et } M. bovis \text{ BCG}\}$. Il est intéressant de noter que les souches algériennes restent phylogénétiquement proches de la souche de référence de *Mycobacterium bovis* avec une distance patristique de $3,43 \times 10^{-4}$.

Le gène PGRS26 présente une séquence relativement variable entre les différentes souches du MTBC, ce qui en fait un bon marqueur pour les analyses phylogénétiques. Son inclusion permet de mieux appréhender les relations évolutives entre les souches de *M. bovis* isolées en Algérie et celles d'autres régions ou pays.

Les résultats obtenus dans le présent travail contribuent à une compréhension approfondie du profil moléculaire de ces isolats et nous incitent à renforcer les efforts de surveillance et de contrôle de la tuberculose bovine en Algérie.

Mots clés : *Mycobacterium bovis*, rpoB, variabilité génétique, analyse phylogénétique, complexe MTB , PGRS26.

Abstract:

In the present study, we report an in silico analysis of sequences of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle in Algeria, obtained by Tazerart et al. (2021), where they performed whole genome sequencing (WGS) of local strains.

Genetic variability of the *rpoB* gene responsible for rifampicin resistance in *Mycobacterium bovis* was analyzed by comparing strains isolated from cattle in Algeria with zoonotic strains, in order to better understand the mechanisms of rifampicin resistance. A phylogenetic study of MTB strains was also carried out, based on analysis of the PGRS26 gene encoding an antigenic protein. The study of the *rpoB* gene was based on genomic sequences, available in the NCBI GenBank database, which were collected for multiple alignment using BioEdit software and visualized using JalView. These sequences were compared with other isolates from different parts of the world, from both cattle and humans. Phylogenetic analysis of the PGRS26 gene was carried out using sequences collected from the same database, curated and aligned using the Phylogeny.fr website, and phylogenetic analysis using MEGA11 software.

Analysis of the *rpoB* gene sequences in local strains revealed a high degree of homology with those of isolates from different geographical regions isolated from cattle, testifying to marked genetic conservation. On the other hand, comparison with zoonotic *M. bovis* strains revealed genetic variability, particularly in the rifampin resistance determining region (RRDR).

The first phylogenetic tree based on the PGRS26 gene of *M. bovis* strains was used to assess the genetic diversity of Algerian strains compared with isolates from around the world. Two main clades were identified, and local strains showed notable genetic stability, with a patristic distance of 9.15×10^{-3} from the reference strain, except for strain CSURQ1134, which was at a distance of 2.734×10^{-3} . The second phylogenetic tree including the MTB complex strains reveals a genetic divergence between these species, while highlighting a conserved ancestral clade $\{M. tuberculosis, M. caprae, M. orygis \text{ and } M. bovis \text{ BCG}\}$. Interestingly, the Algerian strains remain phylogenetically close to the *Mycobacterium bovis* reference strain with a patristic distance of 3.43×10^{-4} .

The PGRS26 gene has a relatively variable sequence between different MTBC strains, making it a good marker for phylogenetic analyses. Its inclusion provides a better understanding of the evolutionary relationships between *M. bovis* strains isolated in Algeria and those from other regions or countries.

The results obtained contribute to an in-depth understanding of the molecular profile of these isolates, and encourage us to strengthen bovine tuberculosis surveillance and control efforts in Algeria.

Key words : *Mycobacterium bovis*, rpoB, genetic variability, phylogenetic analysis, MTB complex, PGRS26

ملخص:

نورد في هذه الدراسة تحليلاً في السيليكو لتسلسل سلالات المتفطرة البقرية المعزولة من الماشية في الجزائر، والتي حصل عليها تازراريت وآخرون (2021)، حيث أجروا تسلسل الجينوم الكامل (WGS) للسلالات المحلية.

تم تحليل التباين الوراثي لجين *rpoB* المسؤول عن مقاومة الريفامبيسين في المتفطرة البقرية من خلال مقارنة السلالات المعزولة من الماشية في الجزائر مع السلالات الحيوانية المنشأ من أجل الحصول على فهم أفضل لآليات مقاومة الريفامبيسين. كما أجريت الدراسة السلالية لسلالات MTB بناءً على تحليل الجين PGRS26 المشفر لبروتين مستضد. استندت دراسة الجين *rpoB* على التسلسل الجينومي المتاح في قاعدة بيانات NCBI GenBank، والتي تم جمعها للمحاذاة المتعددة باستخدام برنامج BioEdit وتم تصورها باستخدام JalView. وقورنت هذه التسلسلات مع عزلات أخرى من مناطق مختلفة من العالم، من الماشية والبشر على حد سواء. تم تنفيذ النهج التطوري من خلال تحليل الجين PGRS26 باستخدام التسلسلات التي تم جمعها من نفس قاعدة البيانات، وتم تنسيقها ومواءمتها باستخدام موقع Phylogeny.fr، وأخيراً تم إجراء التحليل التطوري باستخدام برنامج MEGA11.

كشفت تحليل تسلسل الجين *rpoB* في السلالات المحلية عن درجة عالية من التماثل مع تلك الموجودة في سلالات من مناطق جغرافية مختلفة معزولة من الماشية، مما يشير إلى حفظ جيني ملحوظ. ومن ناحية أخرى، كشفت المقارنة مع سلالات حيوانية المنشأ من بكتيريا *M. bovis* عن وجود تباين وراثي، لا سيما في المنطقة المحددة لمقاومة الريفامبيسين (RRDR).

استُخدمت أول شجرة تطوّر وراثي تستند إلى الجين PGRS26 لسلالات *M. bovis* لتقييم التنوع الجيني للسلالات الجزائرية مقارنةً بالعزلات من جميع أنحاء العالم. تم تحديد سلالتين رئيسيتين وأظهرت السلالات المحلية ثباتاً وراثياً ملحوظاً، حيث بلغت المسافة الوراثية بين السلالة الجزائرية والسلالات المرجعية 9.15×10^{-3} ، باستثناء السلالة CSURQ1134 التي كانت على مسافة 2.734×10^{-3} . تكشف شجرة النشوء والتطور الثانية التي تضم سلالات مركب MTB عن وجود تباعد جيني بين هذه الأنواع مع تسليط الضوء على سلالة سلف محفوظة {*M. tuberculosis*، *M. tuberculosis*، *M. caprae*، *M. orygis*، *M. orygis* و *M. bovis* BCG}. من المثير للاهتمام ملاحظة أن السلالات الجزائرية لا تزال قريبة من الناحية الوراثية من السلالة المرجعية للمتفطرة البقرية بمسافة وراثية تبلغ 3.43×10^{-4} .

يحتوي الجين PGRS26 على تسلسل متغير نسبياً بين سلالات مختلفة من متلازمة البقرات متعددة الخلايا البقرات، مما يجعله علامة جيدة للتحليلات السلالية. ويوفر إدراجه فهماً أفضل للعلاقات التطورية بين سلالات *M. bovis* المعزولة في الجزائر وتلك الموجودة في مناطق أو بلدان أخرى.

وبالتالي، فإن النتائج التي تم الحصول عليها تساهم في فهم متعمق للملف الجيني لهذه العزلات وتشجعنا على تكثيف جهودنا لرصد ومكافحة السل البقري في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: المتفطرة البقرية، *rpoB*، التباين الجيني، التحليل الجيني، التحليل الجيني، مركب السل البقري المتسلسل، PGRS26.

TABLE DES MATIERES

Remerciement	
Résumé :	
Abstract :	
ملخص:.....	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des Abréviations :	
Introduction	Erreur ! Signet non défini.

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I .1- Les Mycobactéries	4
I.1.1. Définition	4
I.1.2. Classification	4
I.1.2.a) Mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ::	4
I.1.2.b) Complexe Mycobacterium tuberculosis (CMTB).....	4
I.2. Généralités sur la tuberculose bovine	6
I.2.1. Définition	6
I.2.2. Historique	6
I.2.3. Physiopathologie	6
I.3. Mycobacterium bovis.....	7
I.3.1. Taxonomie	7
I.3.2. Caractères cultureux	7
I.3.3. Caractères morphologiques	8
I.3.3.a) Structure et composants structuraux	8
I.3.3.b) Génome	9
I.3.4. Comparaison entre le génome de <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. bovis</i>	9
I.3.5. Gènes de résistance	10
I.3.6. Gène de résistance à la rifampicine	11
I.4.La famille des protéines PE_PGRS	14
I.4.1. Définition	14
I.4.2. Evolution	14
I.4.3. Structure	15
I.4.4. Fonctions des protéines PE_PGRS	15
I.4.5. PE_PGRS26	16
I.5. Epidémiologie	17

I.6. Impact sanitaire et économique	17
I.7. Transmission zoonotique de la tuberculose bovine	18
I.8. Prévalence de la tuberculose bovine	18
I.8.1. Dans le monde	18
I.8.2. En Algérie	19
Chapitre II: Matériels et méthodes	
II . Matériels et Méthodes	21
II.1. Souches de <i>Mycobacterium bovis</i> étudiées	21
II.2. Bases de données et logiciels	21
III.2.1. Base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information)	21
II.2.2. Logiciel Bioedit v7.2.5	22
II.2.3. Java Alignment Viewer (Jalview) v2.11.4.0	23
II.2.4. Plateforme phylogeny.fr	24
II.2.5. MEGA v11.0.13	25
II.3. Alignement multiple	26
II.3.1. La récupération des séquences du gène rpoB	26
II.3.2. Alignement du gène rpoB	27
II.4. Analyse phylogénétique	30
II.4.1. Provenance des séquences	30
II.4.2. Alignement multiple et génération de la séquence consensus	31
II.4.3. Recherche des séquences homologues sur BLAST	31
II.4.4. Construction de l'arbre phylogénétique	32
II.4.5. Édition et visualisation de l'arbre sur MEGA 11	33
Chapitre III : Résultats et Discussion	
III. 1. Alignement multiple	37
III.1.1. Alignement des séquences du gène rpoB des souches algériennes :	37
III.1.2 Alignement du gène rpoB avec d'autres séquences de différentes zones géographiques	38
III.1.3. Alignement multiple du gène rpoB isolé du bovin avec d'autres isolés de l'Homme	39
III.2. Analyse phylogénétique	42
II.2.1. Gène PGRS26 chez <i>M.bovis</i>	42
II.2.2. Gène PGRS26 chez le complexe MTB	44
Références	52
Annexe	61

Liste des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique globale schématique du MTBC (Ganzalo et al, 2014).....	5
Figure 2: Morphologie des mycobactéries sous microscope électronique (Institut IGTP, Espagne 2021)	8
Figure 3: Représentation circulaire du génome de <i>Mycobacterium bovis</i> (Garnier et al, 2003).....	9
Figure 4: structure tridimensionnelle du gène <i>rpoB</i> chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (protein-data-base PDB).....	12
Figure 5: Evolution des protéines PE et PPE du genre <i>Mycobacterium</i> et le complexe MTB (Ganzolo et al 2014).....	14
Figure 6: Structure tridimensionnelle de la protéine PGRS26 de <i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97 générée à l'aide d'AlphaFold.	16
Figure 7: Localisation des cinq abattoirs où les cas positifs ont été détectés dans quatre wilayas du nord de l'Algérie. (Tazerart et al, 2021).....	19
Figure 8: Interface de la Base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) ..	21
Figure 9: Interface du logiciel Bioedit (v7.2.5).....	22
Figure 10: Interface du programme Jalview (v2.11.4.0).....	23
Figure 11: Interface de la plateforme phylogeny.fr.....	24
Figure 12: Interface du logiciel Mega11 (v11.0.13)	25
Figure 13: Diagramme explicatif des entrées réalisées pour l'obtention des séquences du gène <i>rpoB</i> des souches <i>M. bovis</i> isolé en Algérie.....	27
Figure 14: Diagramme explicatif des entrées réalisées pour l'obtention des séquences du gène PGRS26 de la souche <i>M.bovis</i>	32
Figure 15: Interface de Gblocks après la curation des séquences PGRS26 sur la plateforme phylogeny.fr	33
Figure 16: Interface du logiciel MEGA11 lors de la création d'un arbre phylogénétique.....	34
Figure 17: Diagramme explicatif montrant la construction de l'arbre phylogénétique en utilisant la plateforme phylogeny.fr et le logiciel MEGA11.....	35
Figure 18: Alignement multiple des cinq séquences <i>rpoB</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> isolées des bovins en Algérie.	37
Figure 19: Alignement multiple de gène <i>rpoB</i> de <i>M.bovis</i> isolé de la souche de référence et d'autres séquences de différentes zones géographiques.....	38
Figure 20: Alignement multiple de gène <i>rpoB</i> de <i>M.bovis</i> des souches algériennes avec ceux des isolats humains	40

Figure 21: Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène PGRS26 de souches de Mycobacterium bovis collectées en Algérie et dans 12 pays entre 1997 et 2023.....	43
Figure 22: Tableau explicatif illustrant les distances patristiques entre les différentes souches de M. bovis, basé sur l'arbre phylogénétique.....	44
Figure 23: Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène PGRS26 de souches de Mycobacterium bovis et espèces apparentées provenant de différentes régions géographiques.....	46
Figure 24: Tableau explicatif montre les distances patristiques entre les souches de complexe MTBC basées sur l'analyse phylogénétique	47

Liste des tableaux

Tableau I: Les gènes de résistance les plus retrouvés chez <i>Mycobacterium bovis</i> (Soliman et al, 2024)	11
Tableau II: Caractéristiques du gène <i>rpoB</i> (NCBI)	12
Tableau III: Liste des mutations du gène <i>rpoB</i> dans différentes études internationales chez <i>M. tuberculosis</i> (Zaw et al, 2018)	13
Tableau IV: Caractéristiques du gène <i>PGRS26</i> (NCBI)	17
Tableau V: Séquences du gène <i>rpoB</i> étudiées de souches prélevées chez l'Homme	28
Tableau VI: Origine des séquences du gène <i>rpoB</i> étudiées isolées du bovin.	29
Tableau I (Annexe) : Séquences du gène <i>PGRS26</i> des souches <i>M.bovis</i> récupérées pour construire un arbre phylogénétique.	
Tableau II(Annexe) : Séquences du gène <i>PGRS26</i> présentes dans différentes souches du complexe MTB utilisées pour la construction d'un arbre phylogénétique	

Liste des Abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BAAR : bacilles acido-alcool-resistant

BCG : bacilles de Calmette et Guérin

CMN : Corynobactéries, Mycobactéries et Nocardia

CMTB : complexe Mycobacterium tuberculosis

esx-1 : ESAT-6 secretion system 1

esx-5 : ESAT-6 secretion system 5

Il : interleukine

IS : séquence d'insertion

MB : Mycobacterium bovis

MNT : Mycobactéries non tuberculeux

NCBI : National Center for Biotechnology Information

OMS : organisation mondiale de la santé

OMSA : organisation mondiale de la santé animale

PE : Proline-glutamate

PE_MPTR : Major-Polymorphic-Tendem-Repeat

PGRS : Polymorphic-Guanine-cytosine-rich-sequence

PNCEBT : Programme national de contrôle et d'éradication de la brucellose et de la tuberculose animale

PPE : Proline-Proline-glutamate

RD : région de différences

RIF : rifampicine

RRDR : Rifampicine-resistance-determining-region

SNP : single Nucleotide polymorphisme

TB : Tuberculose humaine

TBb : Tuberculose bovine

TLR : Tool-Like-Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

Introduction

La tuberculose bovine est l'une des infections zoonotiques qui illustre parfaitement le cas du pathogène sans frontière d'hôte ou géographique (**Dumont et al 2018**). L'agent pathogène responsable de cette maladie est *Mycobacterium bovis* qui appartient au complexe *M. tuberculosis* (MTBC), un groupe qui comprend les agents pathogènes humains étroitement liée à *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium africanum*. Il affecte principalement les bovins ainsi que d'autres animaux et peut être retrouvé chez l'Homme via les produits laitiers non pasteurisés ou la viande contaminée (**Mohammadi et al 2018**).

La tuberculose bovine figure sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) ; la prévalence globale était de 3,27% (2,11-5,05%) pour les animaux et de 18,09% (11,20-27,90%) pour les troupeaux (**Neto et al, 2024**). En Egypte, dans les deux dernières décennies, la prévalence de l'infection chez les bovins a varié entre 0.2% et 4.3% (**Kasir et al, 2023**). En Algérie, l'identification de la circulation des souches de *M. bovis* et de leurs hôtes ainsi que leur répartition géographique sont mal comprises. Peu d'études portant sur la microbiologie ont été rapportées donnant libre champ à la tuberculose bovine de rester une maladie endémique en Algérie (**Tazerart et al 2021**).

Le traitement de la tuberculose en médecine humaine repose sur l'administration combinée de quatre antibiotiques de première ligne sur plusieurs mois : l'isoniazide, la pyrazinamide, l'éthambutol et la rifampicine (**Kposso et al, 2024**). Toutefois, l'émergence de souches mycobactériennes résistantes à ces agents constitue un défi majeur en santé publique à l'échelle mondiale. Parmi ces antibiotiques, la rifampicine joue un rôle clé en ciblant la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne, codée par le gène *rpoB*. Des mutations survenant dans une région spécifique de ce gène, appelée RRDR (*Rifampicin-Resistance-Determining-Region*), sont principalement responsables de l'apparition de la résistance à la rifampicine (**Vargas et al, 2020**). Une caractérisation génotypique est nécessaire pour les souches locales de *M. bovis* dans le but de comprendre l'évolution et l'adaptation des souches en présence de la rifampicine.

Les protéines antigéniques spécifiques du genre *Mycobacterium* sont représentées par la famille PE_PGRS, en particulier du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Le domaine PE qui est conservé dans la région N-terminale précède un domaine polymorphe PGRS riche en résidus de glycine (**Chen et al 2025**). Ce dernier domaine est responsable de la variabilité antigénique et contribue aux mécanismes d'évasion immunitaire, facilitant ainsi la survie des pathogènes (**Sharma et al 2022**). Une étude phylogénétique basée sur une protéine antigénique qui est

Introduction

soumise à une pression immunitaire, serait une bonne approche pour avoir une idée sur l'évolution génétique de cette famille au sein de la population MTB.

Le présent travail a pour premier objectif d'analyser la variabilité génétique du gène de la résistance de la rifampicine *rpoB* chez *Mycobacterium bovis* isolé en Algérie en comparant les souches bovines avec des souches zoonotique isolées chez l'Homme ; et comme deuxième objectif, une étude phylogénétique des souches MTB basée sur l'analyse du gène PGRS26 codant pour une protéine antigénique.

Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I.1- Les Mycobactéries :

I.1.1. Définition :

Le genre *Mycobacterium* est représenté par un nombre de pathogènes stricts et opportunistes qui affectent à la fois les humains et les animaux (**Rastogi et al, 2001**). Il regroupe actuellement plus de 200 espèces différentes (**Ratovonirina 2017**). Ces bactéries ont une croissance très variable selon l'espèce. En distinguant les mycobactéries à croissance rapide à celle à croissance lente (**Ciriac, 2022**). *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium chelonae* et *Mycobacterium smegmatis* sont les mycobactéries à croissance rapide avec un temps de génération de 2 à 5h et forment des colonies visibles en moins de 7 jours. Tandis que les mycobactéries à croissance lente avec un temps de génération moyen de 14 à 15h pour *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae* ainsi qu'environ 20h pour *Mycobacterium bovis*. Ces dernières sont généralement pathogènes et provoquent respectivement la tuberculose humaine (TB), la lèpre et la tuberculose bovine (TBb) (**Kanabalan et al 2021, Ciriac, 2022**).

I.1.2. Classification :

I.1.2.a) Mycobactéries non tuberculeuses (MNT) :

Les mycobactéries non tuberculeuses sont considérées comme des microorganismes environnementaux que l'on peut trouver dans différents environnements, principalement liés à l'eau, le sol, les particules de poussière et les aérosols. Les MNT sont moins virulentes que *Mycobacterium tuberculosis*, sauf quelques-unes qui sont à l'origine d'infections graves et souvent opportunistes chez l'homme. D'autres sont à l'origine des implications vétérinaires importantes comme *Mycobacterium avium* subsp *tuberculosis* qui provoque la paratuberculose connue par la maladie de Johne (**Ciriac, 2022**).

I.1.2.b) Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB):

Le complexe MTB est un groupe d'espèces responsables de la tuberculose chez l'homme et l'animal qui comprend *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii* et *Mycobacterium caprae*. Ces bactéries sont génétiquement apparentées avec une similarité génétique de plus de 99.95 % au niveau nucléotidique et une structure strictement clonale (**Smith et al, 2009**). Des études de génétique évolutive de ce complexe ont affirmé qu'ils ont évolué d'un ancêtre commun (**Labie, 2003, Kanabalan et al, 2021**). Chacune de ces souches possède une spécificité biologique et épidémiologique différente qui se repose sur l'hôte principal et la

région géographique. Il est possible de distinguer ces différentes espèces grâce à des variations moléculaires conservées comme des délétions ou des polymorphismes nucléotidiques **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism), également connues sous le nom de régions de différence (RDs) (**Smith et al, 2006**). Les RDs ont été démontrés comme étant des polymorphismes d'événements uniques, où les mutations ne se sont produites qu'une seule fois dans la phylogénie d'une espèce ; elles sont donc uniques, irréversibles et n'affichent pas d'homoplasie, ce caractère est soutenu par la structure clonale des populations et l'absence d'événements de transfert horizontal de gènes chez le complexe MTB (**Faksri et al, 2016**).

- **Évolution du complexe MTB :**

Le complexe MTB inclut huit lignées phylogénétiquement distinctes en plus du groupe *M. canettii* plus éloignée. *Mycobacterium tuberculosis* constitue les lignés L1, L2 et L7 constituant un vaste ensemble des souches adaptées à l'homme, l'origine de la majorité des cas de la tuberculose humaine dans le monde. Les lignées *M. africanum* L5 et L6 restreintes aux humains d'Afrique de l'Ouest ont un lien avec la huitième lignée qui comprend les diverses souches adaptées aux animaux dont *M. bovis* étant le plus en aval de la phylogénie (Fig. 1) (**Ganzalo et al 2014**).

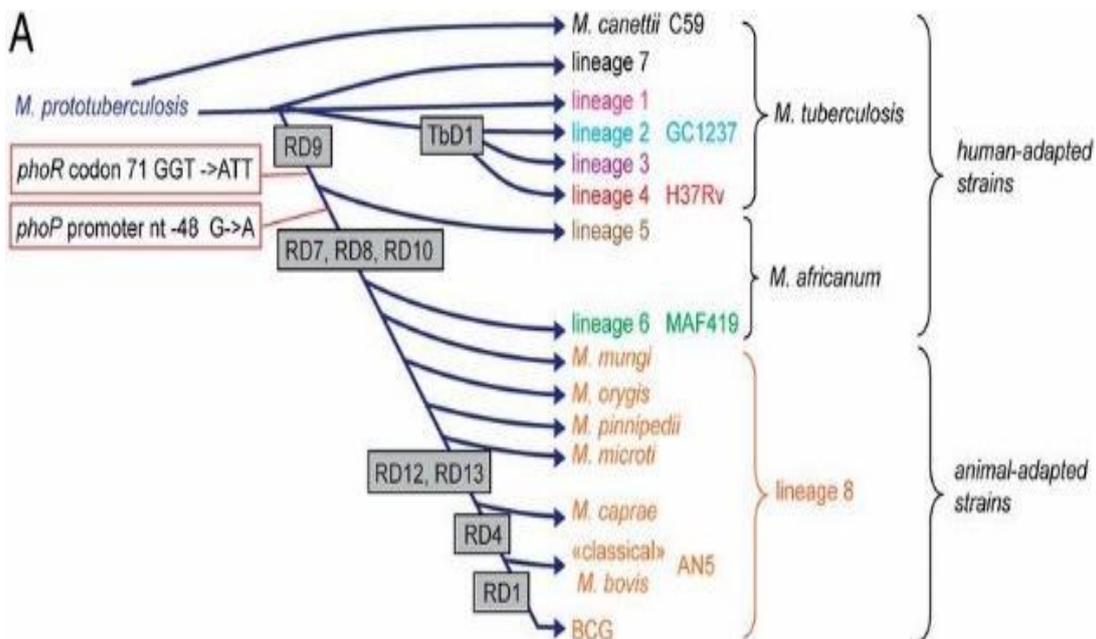


Figure 1: Arbre phylogénétique globale schématisé du MTBC (Ganzalo et al, 2014)

I.2. Généralités sur la tuberculose bovine :

I.2.1. Définition :

La tuberculose bovine est une maladie infectieuse zoonotique chronique qui menace le bétail et une variété des animaux sauvages ainsi que d'autres mammifères y compris l'homme (**Kao et al, 2016**). Elle est causée par le bacille *Mycobacterium bovis* qui affecte principalement les ganglions lymphatiques en provoquant des nodules dit « **tubercules** » d'où vient l'appellation de la pathologie, par la suite elle se propage vers d'autres organes comme les poumons, le tube digestif, le foie, les organes génitaux, la mamelle et l'œil (**Dubois, 2002**), qui peuvent devenir chronique (**Tazerart , 2021**). Selon l'OMSA « l'organisation mondiale de la santé animale » la tuberculose bovine est très répandue en Afrique, et certaines zones d'Asie ainsi que d'autres pays développés comme l'Europe et l'Amérique (**OMSA, 2019**).

I.2.2. Historique :

La tuberculose est l'une des maladies infectieuses les plus dévastatrices dans l'histoire de l'humanité (**Brosch et al, 2015**), elle existe depuis plusieurs milliers d'années mais elle a été mieux comprise en **1882** grâce à la découverte des bacilles tuberculeux par le fondateur de la bactériologie, le médecin allemand Robert Koch. Peu après, et à la fin des années **1889**, un autre agent pathogène majeur dans les élevages bovins appelé *Mycobacterium bovis* a été identifié mais il a été officiellement nommé en **1970** (**Karlson et Lessel, 1970**). En **1902**, les deux scientifiques Albert Calmette et Camille Guérin qui font les expériences sur les animaux en bactériologie et en médecine vétérinaire, ensemble ils étudièrent l'infection tuberculeuse des bovins produite par voie orale et se sont concentré particulièrement sur la modalité d'entrée des bacilles bovins virulents au niveau de la muqueuse digestive (**Lagrange, 1998**). En **1908**, Ils ont isolé des bacilles bovins et l'ont cultivée sur un milieu contenant de la bile de bœuf et des pommes de terre glycinées dans des conditions spécifiques pour en réduire la virulence. Après 13 ans et 230 sous cultures successives ils obtiennent une souche atténuée capable de conférer une immunité à la tuberculose sans provoquer la maladie dont le premier vaccin appelé BCG (bacille de Calmette et Guérin) pour la lutte contre la tuberculose humaine et bovine et qui reste utilisé jusqu'à aujourd'hui (**Lagrange, 1998**). Par comparaison avec *M. tuberculosis*, la souche *M. bovis* BCG présente dix délétions, trois d'entre elles sont les mêmes que celle qui avait été décrite chez *M. bovis* , les sept autres ont été désignées RD4 à RD10 (**Labie, 2003**) .

I.2.3. Physiopathologie :

La contamination des hôtes mammifères par l'agent tuberculeux est principalement par voie respiratoire. La bactérie infecte les poumons, où elle est phagocytée par les macrophages

et les cellules dendritiques alvéolaires donnant lieu à des phagosomes qui vont se fusionner avec les lysosomes. (Forrelad et al, 2013).

Les mycobactéries pathogènes développent plusieurs mécanismes pour contourner cet environnement en inhibant la fusion phagosome-lysosome. Par conséquent, l'infection est généralement contenue avec formation de granulome ou les bactéries peuvent entrer dans un état de dormance provoquant une **tuberculose latente**. Dans des cas d'immunodépression, ils peuvent se réactiver et se propager vers d'autres organes (Forrelad et al, 2013).

I.3. Mycobacterium bovis:

I.3.1. Taxonomie:

Selon Ciriac (2022), l'organisation taxonomique de la bactérie *Mycobacterium bovis* est comme suit :

- **Domaine :** *Bacteria*
- **Classe :** *Actinobacteria*
- **Sous-classe :** *Actinobacteridae*
- **Ordre :** *Actinomycetales*
- **Sous-ordre :** *Corynebacterineae*
- **Famille :** *Mycobacteriaceae*
- **Genre :** *Mycobacterium*
- **Espèce :** *Mycobacterium Bovis*

I.3.2. Caractères cultureux :

Les mycobactéries sont apparentées aux bactéries Gram positive par leur composition en peptidoglycane au sein de la paroi cellulaire. Elles ne sont pas détectées de manière fiable par la coloration de Gram traditionnelle car leur paroi cellulaire hydrophobe résiste à la pénétration des colorants. En présence de phénol et de chaleur appliquée, la colorante phéniquée fuchsine peut être utilisée, comme lors de la coloration de Ziehl-Neelsen, qui utilise également le bleu de méthylène comme contre-colorant. Étant donné que ces complexes colorants de paroi cellulaire sont résistants à la décoloration par les acides minéraux, les mycobactéries sont appelées « bacilles acido-alcool-résistants » ou « BAAR ». La plupart des espèces de *Mycobacterium*, y compris MTBC, se développent mieux à une température de 35 à 37 °C. Comme de nombreuses bactéries aérobies, leur croissance est stimulée par l'incubation dans de

l'air contenant 5 à 10 % de CO₂. Les espèces de NTM sont des bactéries à croissance lente, il peut falloir plusieurs semaines pour que les colonies deviennent visibles sur les plaques de culture qui sont généralement conservées pendant 6 à 8 semaines. Les colonies de MTBC sont généralement sèches, rugueuses et de couleur crème ou beige, et sont communément appelées « rugueuses et chamois » à l'inverse, les colonies de *M. bovis* sont plates et lisses (Caulfield et Wengenack, 2016)

I.3.3. Caractères morphologiques :

I.3.3.a) Structure et composants structuraux :

Les mycobactéries possèdent une structure des bacilles bâtonnets fins, à gram positif, acidophiles, non mobiles ; droits ou légèrement incurvés (Fig. 1), inaptes à former des endospores et ne possèdent pas de capsule. Ces bactéries ont une taille de 1 à 20 µm de long et 0.2 à 0.6 µm de large (Fig. 2) (Ciriac, 2022) .



Figure 2: Morphologie des mycobactéries sous microscope électronique (Institut IGTP, Espagne 2021)

- **Paroi cellulaire et enveloppe :**

L'enveloppe cellulaire des mycobactéries joue un rôle fondamental dans l'adaptation à l'intérieur de la cellule hôte, elle stimule leur adhésion aux macrophages en inhibant les mécanismes microbicides provoquant la mort cellulaire. Leur paroi cellulaire est riche en lipides, qui sont classés en deux catégories : lipides fortement liés et des lipides faiblement liés (Rastogi et al, 2001). Trois composants principaux constituent l'enveloppe des mycobactéries : (i) la membrane cytoplasmique, (ii) une paroi cellulaire abondante en lipides et en sucres et (iii) une capsule composée de polysaccharides et de protéines. Cette dernière est constituée de peptidoglycane, d'arabinogalactane et d'acides mycoliques. (Koumba , 2010).). Les acides

mycoliques des bactéries acido-résistantes contribuent à la formation de l'enveloppe mycobactérienne, avec sa structure et ses fonctions globales. Ils servent également de barrière perméable, capable de résister à une multitude d'agents thérapeutiques courants tels que les antibiotiques et les désinfectants. (Chaubey et al 2021). L'architecture ressemble à celle des corynébactéries et des Nocardia d'où la création du super groupe CMN : Corynebactéries, Mycobactéries, et Nocardia qui les distinguent des autres bactéries. (Ventura et al 2007)

Composants cellulaires :

Mycobacterium tuberculosis, l'agent causal de la tuberculose, contient une molécule d'ADN simple, circulaire et double brin, et des ribosomes dispersés dans le cytoplasme (Yamada et al 2015)

I.3.3.b) Génome :

Le premier séquençage du génome entier de *Mycobacterium bovis* était en 2003, comportant 4 345 492 pb disposé en chromosome circulaire unique avec une teneur en CG de 65,63 %. Le génome contient 3 952 gènes codant pour des protéines, dont un prophage et 42 éléments IS (séquences d'insertions) (Fig. 3) (Garnier et al, 2003).

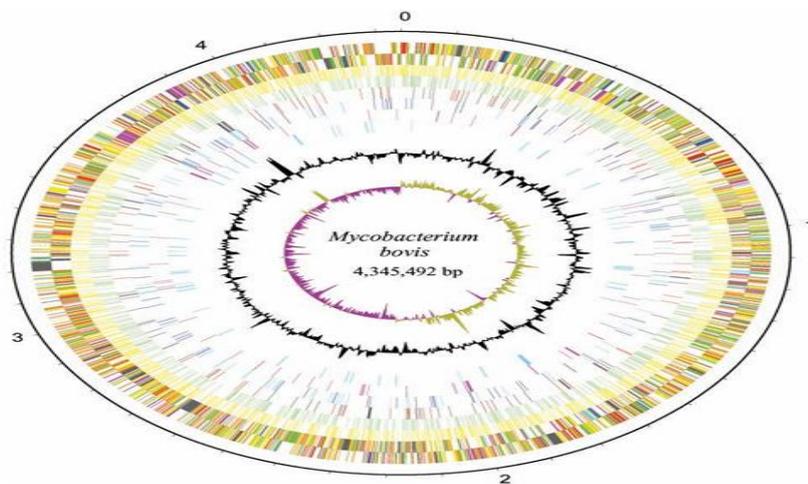


Figure 3: Représentation circulaire du génome de *Mycobacterium bovis* (Garnier et al, 2003)

I.3.4. Comparaison entre le génome de *M. tuberculosis* et *M. bovis* :

Bien que la tuberculose humaine et animale soit cliniquement indiscernable et que *M. bovis* soit phylogénétiquement lié à *M. tuberculosis*, les génomes des deux espèces présentent au moins 1200 polymorphismes de séquence unique et sept régions de différence (RD), qui ne sont pas présents chez *M. bovis*. Parmi ces variations *M. bovis* et *M. tuberculosis* présentent des mutations silencieuses dans 20 régulateurs transcriptionnels ou systèmes à deux composants PhoP/PhoR. Ces systèmes régulent divers aspects du métabolisme mycobactérien et ils jouent

un rôle central dans l'interaction entre les mycobactéries pathogènes et leur hôtes (**Gracia et al 2020**).

Une autre étude basée sur l'identification et la caractérisation de la variabilité génétique entre les deux souches de référence (*M. tuberculosis* H37Rv et de *M. bovis* AF2122/97) a identifiée deux différences majeures :

- Le gène **Rv3479** codant pour une protéine transmembranaire de 3 225 pb présente chez les deux bactéries dont son rôle reste mal connu. Cependant, le gène orthologue chez *M. bovis* AF2122/97 présente une délétion de 714 pb débutant de la position 1254 à partir du codon d'initiation ATG. Cette délétion génère deux cadres de lecture ouverts ORF (Open-Reading-Fram) plus petits, dont les séquences sont presque identiques à celle de **Rv3479** (**Amadio et al, 2005**).
- Une variation au niveau du gène **rpfA**, un gène de 1 221 pb qui code pour un facteur de résurrection des bactéries en dormance. La partie centrale de la protéine contient des répétitions APADLAPP, la souche de *M. bovis* est dépourvue de cette partie en raison d'une délétion intragénique de 240 pb (**Amadio et al, 2005**).

I.3.5. Gènes de résistance :

Les mycobactéries ont développé une résistance aux antibiotiques pour s'adapter et survivre malgré la présence d'une molécule antimicrobienne grâce à l'accumulation des mutations dans les gènes cibles (**Heym et Cole 1996**).

Chez *Mycobacterium bovis*, les mutations spontanées dans certains gènes essentiels à la croissance bactérienne lui procurent des gènes de résistance à des antibiotiques. La détection de ces mutations par les techniques avancées de biologie moléculaire comme le séquençage du génome entier est crucial pour comprendre l'évolution de cette souche (**Soliman et al, 2024**). Les gènes de résistance les plus retrouvés chez *M. bovis* sont classés dans le tableau I.

Tableau I: Les gènes de résistance les plus retrouvés chez *Mycobacterium bovis* (Soliman et al, 2024)

Gène	Protéine	Locus	Antibiotique
<i>rpoB</i>	Sous unité β de l'ARNp	Rv0667	Rifampicine (RIF)
<i>rpoC</i>	Sous unité β' de l'ARNp		
<i>katG</i>	Catalase peroxydase	Rv1908c	Isoniazide
<i>ahpC</i>	Sous unité de l'alkyl Hydroperoxyde réductase	Rv2428	
<i>rpsL</i>	30S protéine ribosomique S12	Rv0682	Streptomycine
<i>embB</i>	Arabinosyl-transféraseb	Rv3795	Ethambutol
<i>embC</i>	Arabinosyl-transférasec	Rv3793	
<i>embR</i>	Régulateur transcriptionnel	Rv1267c	
<i>gyrA</i>	ADN gyrase sous-unité A	Rv0006	Fluoroquinolones
<i>gyrB</i>	ADN gyrase sous unité B	Rv0005	
<i>pncA</i>	Pyrazinamidase /nicotinamidase	Rv2043c	Pyrazinamide

I.3.6. Gène de résistance à la rifampicine :

La résistance des mycobactéries à la rifampicine est associée à quatre gènes essentiels **rpoA**, **rpoB**, **rpoC** et **rpoZ** codants pour les sous unités de l'ARN polymérase α , β , β' et ω respectivement. De plus, il existe une région appelée Rifampicin Resistance-Determining Region « **RRDR** » représentée par 81 pb au niveau de la séquence du gène *rpoB* ou 95 % des mutations connues dans cette région confèrent une résistance à cet antibiotique (**Vargas et al, 2020**).

I.3.6.a) Mode d'action de la rifampicine :

La rifampicine est l'un des antibiotiques à spectre large utilisé en associations avec d'autres antibiotiques dans la lutte contre la tuberculose depuis 1967 (**Heym et Cole, 1996**). Elle entraîne la mort bactérienne en se liant à la sous unité β de l'ARN polymérase bactérienne, bloquant ainsi la transcription de l'ARN (**Vargas et al 2020**). Des mutations spontanées dans des gènes codant pour la sous unité β de l'ARN p affectent une région de 22 acides aminés modifiant la structure de cette dernière ainsi que le site de liaison à la rifampicine (**Sechi et al, 2001**).

I.3.6.b) Gène rpoB :

Le gène rpoB est affirmé comme un gène crucial pour les études phylogénétiques et l'identification des bactéries (Adékambi et al, 2008). (Fig. 4)



Figure 4 : Structure tridimensionnelle du gène rpoB chez la souche de référence H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID : 4KBJ)

- **Caractéristiques du gène :**

Les caractéristiques du gène rpoB dans le génome de *Mycobacterium tuberculosis variant bovis* selon la souche de référence AF2122/97 sur NCBI sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau II: Caractéristiques du gène rpoB (NCBI)

Gène	rpoB
Emplacement	De 761576 à 765094
Longueur	3519 pb
Position du gène	2217
Longueur de la protéine	1172

- **Mutations fréquentes sur le gène rpoB :**

Environ 90 à 95 % des isolats résistants à la RIF ont été associés à des mutations dans un fragment de 81 pb du rpoB situé entre les positions 426 et 452 représentant la région RRDR chez *M. tuberculosis* (Li et al, 2021).

En 2021, L'OMS (OMS, 2021b) a publié un catalogue des mutations des gènes de résistance aux ATB du complexe MTB dont les mutations associées à la résistance à la rifampicine qui ont été classé selon leur localisation dans la séquence du gène rpoB :

Chapitre I : Synthèse bibliographique

- Au niveau de la région RRDR qui s'étend des codons 426 à 452 : **Ser450Tyr**.
- Les mutations **Val170Phe** et **Ile491Phe** sont restées les seules mutations situées en dehors de la région conférant une résistance à la rifampicine.

Selon une étude réalisée en Egypte, des souches cliniques de *Mycobacterium bovis*, portées les mutations suivantes (Soliman et al, 2024) :

1. Asp435Phe
2. Asp435His
3. Gap 1287_1289

Dans le but d'identifier les types des mutations du gène rpoB et leur fréquence au Maroc, une étude basée sur la caractérisation moléculaire des souches *Mycobacterium tuberculosis* isolés au nord du Maroc dont les mutations fréquentes étaient (Karimi et al, 2020) :

1. Ser531Leu
2. Ser531Trp

A travers le monde, la mutation Ser531Leu est la plus fréquente (Tableau III).

Tableau III:Liste des mutations du gène rpoB dans différentes études internationales chez *M. tuberculosis* (Zaw et al, 2018)

Pays (année)	Mutation dans RRDR	Mutation hors RRDR
Brésil (2015)	Ser531Le, Ser531Trp, Asp516Phe	Phe505Val, Ile572Val
Inde (2015)	Ser531Leu, His526Tyr, Asp516Val, Arg511Cys, Val513Asp, Glu521Asp	Asn413His, Asp435Glu, Ala451Asp
Vietnam (2011)	Ser531Leu, Ser531Trp, Ser531Phe, Ser531Gln, His526Leu, His526Asn, His526Arg, His526Tyr, His526Ser, Asp516Val, Leu530Met	Gln490His, Gln490Arg
Afrique du Sud (2016)	MDR-TB : Ser531Leu, His526Leu, Asp516Tyr, Leu533Pro XDR-TB: Asp516Gly, Leu533Pro, Ser531Leu	Pro535Thr, Ile572Met, Tyr645His
Chine (2010)	Mutations aux codons 531, 526, 516, 511, 522, 533, 550, 509 et 572	Val550Leu
Pakistan	Ser531Leu, Asp516Val, Asp516Tyr	Ser512Ile, Leu533Pro

I.4. La famille des protéines PE_PGRS :

I.4.1. Définition :

La famille des protéines PE (proline -acide glutamique) comprend un groupe d'antigènes mycobactériens exposés à la surface de leurs membranes (Maio et al, 2020). Elles sont codées par une unique famille des gènes multigéniques PE_PGRS (Polymorphic Guanine-Cytosine-Rich Sequence) (Tian et Xie, 2010). Il est intéressant de noter que dans le complexe MTB, environ 7% du génome est représenté par ces gènes (Band et al, 2025)

I.4.2. Evolution :

Les gènes PE_PGRS sont regroupés dans une région du génome sous forme des gènes chevauchants résultant par plusieurs événements évolutifs, de duplication et de recombinaison génétique (Maio et al, 2020). Leurs ancêtres ont été les premiers à être associés au locus génétique **esx-1** (ESAT-6-secretion-System 1) codant pour le prototype des systèmes de sécrétion de type VII (T7SS) . La duplication du cluster **esx-1** suivie de multiple autres évènements a entraîné une expansion de ces familles au sein des espèces mycobactériennes à croissance lente .Il est intéressant de noter que l'apparition des gènes PE-PGRS et PE_MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeat) ont suivi l'émergence d'un autre locus appelé **esx-5** (ESAT-6 Secretion System 5) (Fig. 5) (Maio et al 2020)

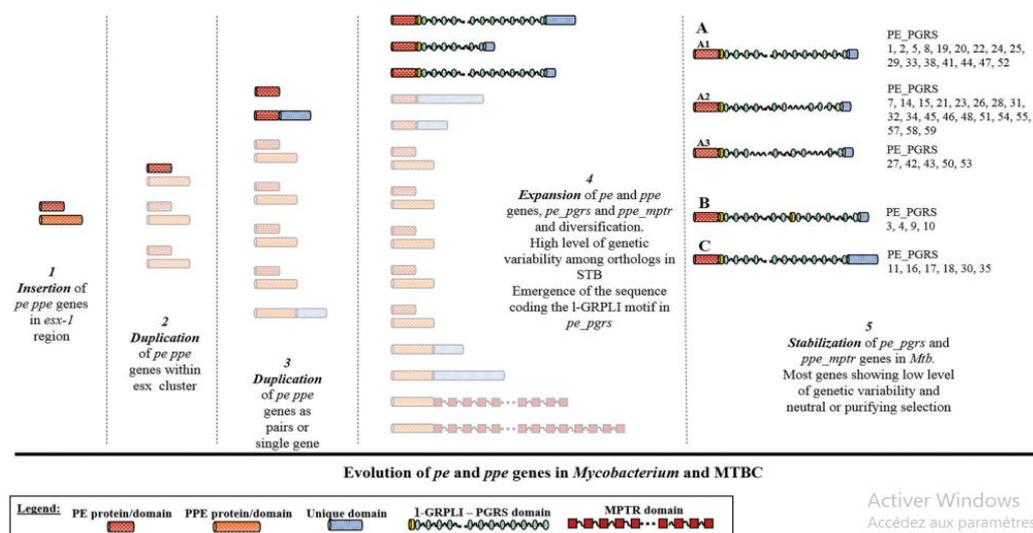


Figure 5: Evolution des protéines PE et PPE du genre Mycobacterium et le complexe MTB (Ganzolo et al 2014)

I.4.3. Structure :

Les protéines du domaine **PE** se caractérisent par la présence d'un motif Proline-acide glutamique (**PE**) aux positions huit à neuf dans un domaine N terminal hautement conservé qui consiste en environ 110 acides aminés. De même les protéines **PPE** portent un motif Proline-Proline acide glutamique (**PPE**) aux positions sept à neuf dans le domaine N terminal d'environ 180 acides aminés. Les domaines C terminaux des protéines PE et PPE sont très variables. Ces dernières sont codées par des gènes avec une forte fréquence de séquences répétitives riches en **GC** qui diffèrent par leur nombre et copies entre les espèces apparentées. Chez les Mycobactéries du complexe MTB, le domaine PE est dominé par de multiples répétitions riche en glycine (répétition GGA-GGX) ou en X (représente l'un des acides aminés connues), dénommée la sous famille **PE_PGRS** (Band et al, 2025).

I.4.4. Fonctions des protéines PE_PGRS :

La présence de la famille des protéines **PE/PPE/PE_PGRS** uniquement dans les souches pathogènes du genre *Mycobacterium* tel que *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium bovis* indique son importance probable dans la pathogenèse des maladies. Ces protéines ont été majoritairement rapportées comme étant soit exposées à la surface ou bien sécrétées. Elles jouent un rôle important dans le développement de la pathogenèse mycobactérienne en modulant l'évasion au système immunitaire de l'hôte (Sharma et al, 2022).

I.4.4.a) Modulateurs de la réponse immunitaire de l'hôte :

Les mycobactéries pathogènes infectent principalement les macrophages qui agissent comme un réservoir pour le pathogène en utilisant une variété de moyens contre les mécanismes de protection médiés par les cellules immunitaires. Les protéines **PE/PPE**, **PE_PGRS** et **PPE-MPTR** constituent la majorité des protéines PE/PPE, qui sont associées à la paroi cellulaire et ont une nature sécrétoire. Certaines de ces protéines contrôlent également la réponse immunitaire de l'hôte en augmentant la production des cytokines qui déclenchent une inflammation pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Par exemple, PPE 37 module la réponse pro-inflammatoire chez l'hôte en diminuant la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF (Sharma et al, 2022).

I.4.4.b) Interaction avec la voie de signalisation des TLR :

Les protéines PE_PGRS peuvent interagir avec la voie de signalisation des TLR (Toll Like Receptor) en tant que récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires présent sur la paroi cellulaire des mycobactéries entraînent ainsi des événements de signalisation intracellulaire tels que l'activation des cellules immunitaires innées, la sécrétion des cytokines pro inflammatoire et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. A titre d'exemple, le PE_PGRS33 qui se localise au niveau de membrane mycobactérienne interagit avec le TLR2 des lymphocytes T et déclenche la voie de signalisation TLR2 (**Chen et al, 2025**).

I.4.4.c) Source majeur de la variabilité antigénique :

Certaines protéines PE_PGRS sont des antigènes bien établis et sont activement impliquées dans l'interaction avec l'hôte. Le même anticorps peut avoir une réactivité croisée avec une variété d'antigènes PE_PGRS, indiquant qu'il existe des épitopes partagés parmi les diverses protéines PE_PGRS qui pourraient se trouver dans leur séquence conservée. La richesse en GC résultant des copies en tandem de répétition de 9 pb CGGCGGCAA pourrait être le point chaud pour la recombinaison ainsi que le glissement de brin pendant la réplication et donc la source de la variation des PE_PGRS (**Tian et Jian, 2010**).

I.4.5. PE_PGRS26 :

PGRS_26 est une protéine de 491 acides aminés chez *Mycobacterium tuberculosis* et présente une similarité de structure et de fonction avec un autre membre de la même famille, PGRS33 avec un pourcentage d'identité de 53 % (Fig. 6). Chez les macrophages infectés, PGRS26 subit une régulation négative, entraînant une diminution de son expression (**Tian et Jian 2010**).

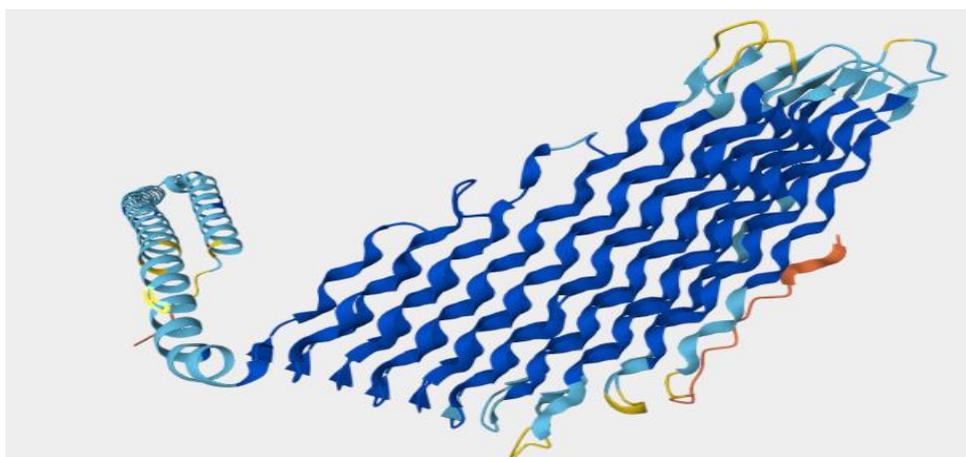


Figure 6: Structure tridimensionnelle de la protéine PGRS26 de *Mycobacterium bovis* AF2122/97 (UniProt ID : Q79FP3)

Les caractéristiques du gène PGRS26 dans le génome de la souche de référence *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv sur NCBI sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IV: Caractéristiques du gène PGRS26 (NCBI)

Gène	PGRS26
Emplacement	Complément (1618209-1619684)
Longueur	1476 nt
Position du gène	690
Longueur de la protéine	491AA

I.5. Epidémiologie :

L'infection par *Mycobacterium bovis* cause d'une maladie difficile à gérer et à éradiquer. L'une de ces difficultés réside sur la capacité à se propager entre les différentes espèces y compris les bovins, mais également de nombreuses autres espèces sauvages tel le blaireau d'Eurasie (*Meles meles*) en Irlande et au Royaume-Uni, le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), le bison (*Bison bison*) et l'élan (*Cervus canadensis*) en Amérique du Nord, le sanglier (*Sus scrofa*) et les espèces de cerfs en Europe, ainsi que le buffle d'Afrique (*Syncerus caffer*) en Afrique australe (Corner et al, 2011).

Dans les pays de la région Moyen-Orient et Afrique du Nord (MENA), plusieurs facteurs de risque semblent jouer un rôle clé dans la propagation de *Mycobacterium bovis* chez les animaux. Des éléments tels que l'âge, le sexe, l'état général de l'animal, un affaiblissement du système immunitaire, le surpeuplement, les contacts entre espèces, les habitudes de pâturage, le mode d'alimentation, l'environnement ou encore les conditions climatiques, sans oublier certaines variations physiologiques ou pathologiques, peuvent tous favoriser la dissémination de cette bactérie à potentiel zoonotique (Kasir et al, 2023).

I.6. Impact sanitaire et économique :

La pandémie de la tuberculose bovine exerce un impact sanitaire majeur sur la santé animale qui est souvent observé sous forme d'une faiblesse, perte d'appétit et de poids et une fièvre irrégulière (OMSA, 2019). La tuberculose bovine entraîne principalement des pertes économiques importantes dans les fermes en raison d'une mortalité élevée et d'une diminution de la production laitière et carnée. L'évaluation de ces pertes dans quelques pays où l'élevage

domestique joue un rôle majeur montre un accroissement des coûts de production (Tialla et al, 2021).

I.7. Transmission zoonotique de la tuberculose bovine :

La notion de la tuberculose zoonotique comprend tous les cas de la tuberculose humaine qui ne sont pas due par *Mycobacterium tuberculosis* mais plutôt par les Mycobactéries généralement isolés chez les animaux notamment *Mycobacterium bovis* (Hauer, 2015).

Les animaux infectés développent généralement une tuberculose latente et asymptomatique, durant laquelle le système immunitaire contrôle la prolifération du bacille et pendant cette phase, l'animal atteint diffuse silencieusement le pathogène aux autres animaux (Dumont et al, 2018). Dans les pays en voie de développement, qui sont considérés comme des zones à forte prévalence de la tuberculose bovine, la contamination peut être professionnelle avec une transmission de l'infection direct des bovins aux éleveurs par voie respiratoire ou bien indirect due à la consommation du lait cru ou de la viande contaminée (Haddad, 2013).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), il est estimé que *Mycobacterium bovis* serait lié à plus de 3 % des cas mondiaux de tuberculose chez l'homme. Les cas ont été principalement dépistés dans les pays en développement, et plus précisément en Afrique subsaharienne ou chaque année, on dénombre 70 000 nouveaux cas de tuberculose humaine à MB. Toutefois, ces statistiques semblent sous-évaluées, car dans ces zones où la tuberculose humaine est très répandue, l'identification microbiologique des cas de tuberculose est rarement effectuée et consignée. (Dumont et al, 2018).

Des transmissions interhumaines par voie aérienne ont finalement été rapportées, bien qu'elles demeurent faiblement documentées dans lesquelles l'humain peut présenter différents tableaux cliniques : guérison spontanée, maladie, infection latente et éventuellement réactivation ou réinfection. (Dumont et al, 2018).

I.8. Prévalence de la tuberculose bovine :

I.8.1. Dans le monde :

La tuberculose bovine est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire par l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA). Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés, notamment l'âge des animaux, la taille du troupeau, la cohabitation avec d'autres espèces, l'introduction de nouveaux animaux, ainsi que le type d'exploitation (viande, lait ou mixte). Une méta-analyse regroupant des études menées entre 1993 et 2023 à l'échelle mondiale a révélé une prévalence plus élevée en Asie, atteignant 8,19 % chez les animaux. À l'inverse,

l'Amérique du Sud qui présentait une prévalence assez faible estimée à 0,36 %. Au Brésil, après plus de vingt ans de mise en œuvre d'un programme national de contrôle et d'éradication de la brucellose et de la tuberculose animale (PNCEBT), la prévalence est devenue extrêmement basse, avec seulement 0,009 % chez les animaux et 0,16 % au niveau des troupeaux. (Neto et al, 2024). En Afrique subsaharienne la tuberculose bovine est une maladie endémique qui touche le bétail et a été recensée dans 42 des 54 pays du continent. La fréquence diffère selon les régions, les races concernées et le genre d'élevage (Tschopp, 2020)

Par rapport au pays du nord, la tuberculose est presque maîtrisée en tant que question de santé animale, l'abattage systématique des bovins présentant une réaction tuberculique positive et la mise en place d'un programme de lutte contre la tuberculose bovine ont considérablement réduit cette maladie dans les cheptels bovins. De plus, l'instauration généralisée de la pasteurisation du lait a complètement stoppé la transmission de la tuberculose bovine aux populations humaines. Ces mesures de contrôle ont considérablement réduit le risque de transmission zoonotique de MB à l'homme (Dumont et al, 2018).

I.8.2. En Algérie :

En Algérie, la tuberculose bovine est également connue pour être repérée malgré les tentatives gouvernementales de contrôle de la maladie (Sahraoui et al, 2009). En 2021, une étude faite par Tazerart et ses collaborateurs, a montré une estimation de 2,049,652 carcasses bovines suspectées d'être atteintes de tuberculose dans le pays. Au sein de cette population 94 ont été testé positivement pour *Mycobacterium bovis* (Fig. 7) (Tazerart et al, 2021).

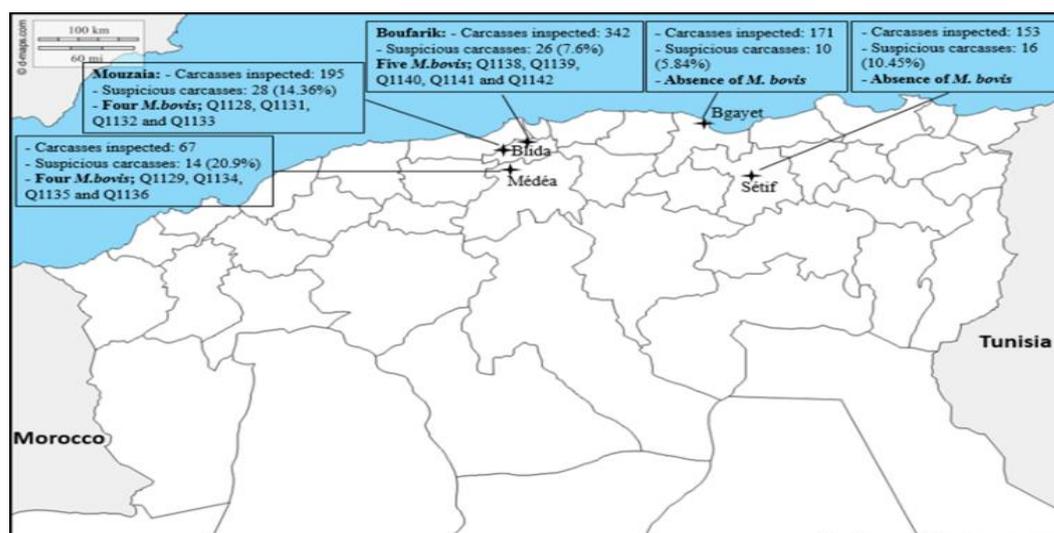


Figure 7: Localisation des cinq abattoirs ou les cas positifs ont été détectés dans quatre wilayas du nord de l'Algérie. (Tazerart et al, 2021).

Chapitre II

Matériels et

Méthodes

II . Matériels et Méthodes :

II.1. Souches de *Mycobacterium bovis* étudiées :

Les séquences des souches de *Mycobacterium bovis* proviennent de l'étude de Tazerart et al , (2021) , qui ont fait pour la première fois le séquençage du génome entier WGS des souches *Mycobacterium bovis* isolées en Algérie chez les bovins. L'étude a permis de caractériser 13 souches formant trois génotypes distincts. Nous avons sélectionné 5 souches de différents génotypes et leurs séquences ont été téléchargées de la base de données National Center for Biotechnology Information (NCBI) (au format Fasta).

II.2. Bases de données et logiciels :

III.2.1. Base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) :

C'est une ressource essentielle pour la recherche scientifique internationale et constitue l'un des piliers de la recherche biomédicale actuelle. Fondé en 1988 sous la tutelle des National Institutes of Health (NIH) américains. NCBI constitue un réseau lié à des ressources cruciales telles que GenBank (le plus grand dépôt de séquences ADN/ARN au monde) (Fig. 8), PubMed (base de données pour les articles biomédicaux) et ClinVar (une véritable ressource riche en informations sur les mutations génétiques associées aux pathologies). Des instruments tels que BLAST, qui mettent en parallèle des séquences génétiques en quelques secondes. Le NCBI est essentiel pour les chercheurs dans les domaines de la bio-informatique, de la génomique, de la médecine et de la biologie évolutive. Les données ouvertes favorisent la recherche scientifique, l'établissement de diagnostics médicaux et le progrès en matière de traitements. On l'utilise universellement comme norme pour la normalisation et le partage des informations biologiques.

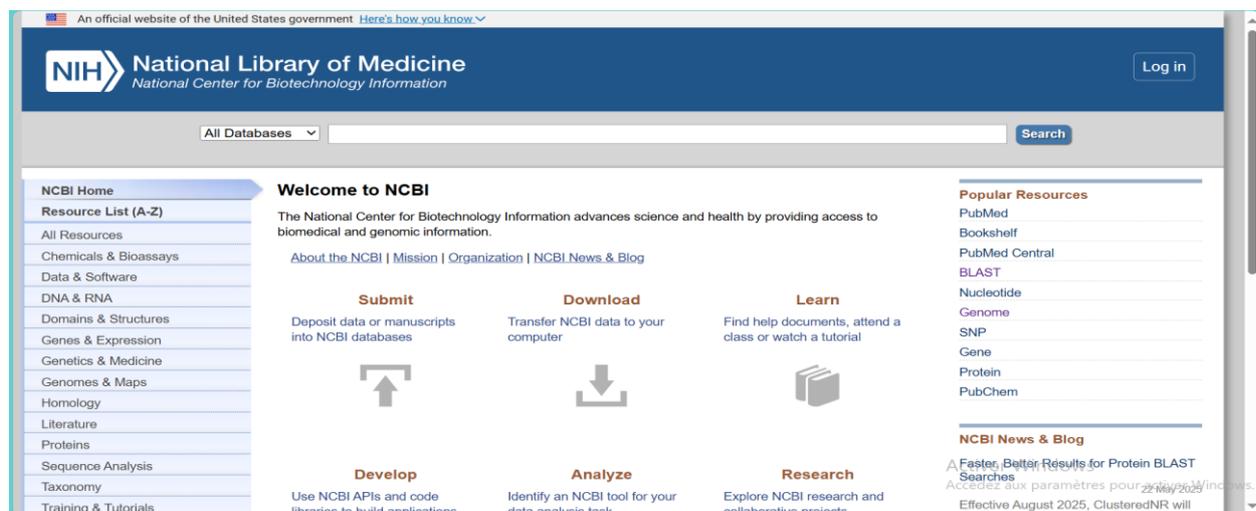


Figure 8: Interface de la Base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information)

II.2.2. Logiciel Bioedit v7.2.5:

C'est un logiciel de modification d'alignement de séquence biologique développé par Tom Hall (Hall, 1999). Son interface et ces outils facilitent l'ajustement et la gestion des séquences sur l'ordinateur. Un éditeur de séquences gratuit et largement utilisé en bioinformatique (Fig.9). Ce logiciel facilite l'alignement multiple des séquences grâce à l'algorithme ClustalW intégré ainsi que diverses manipulations comme la visualisation, l'édition manuelle, le marquage des résidus conservés...etc. La sélection de Bioedit était pour sa simplicité d'utilisation et sa capacité à gérer divers formats de fichier (FASTA, GenBank) ainsi que sa capacité à incorporer d'autres outils tels que Blast.

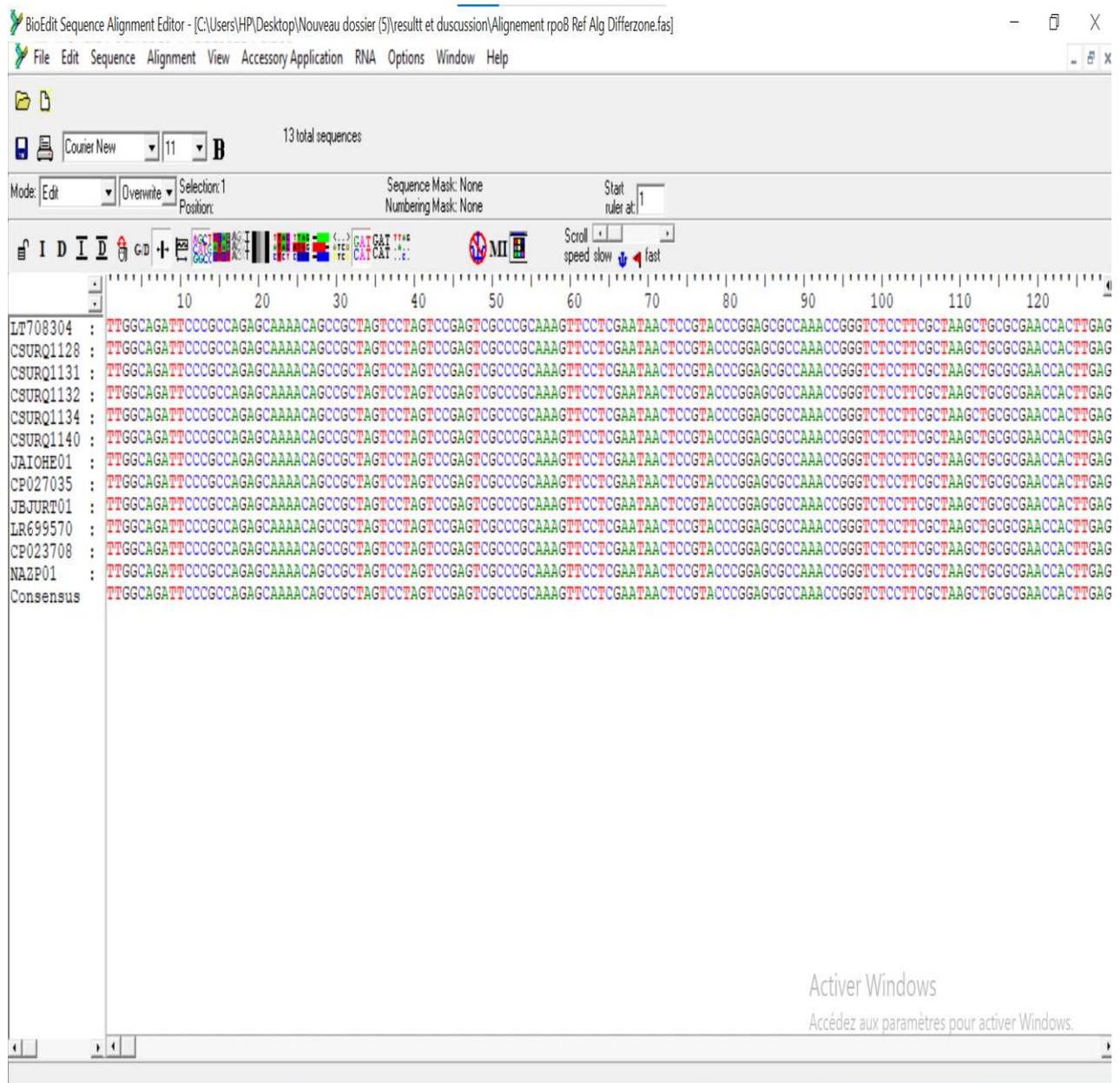


Figure 9: Interface du logiciel Bioedit (v7.2.5)

II.2.3. Java Alignment Viewer (Jalview) v2.11.4.0 :

Utilisé comme outils de visualisation, il facilite et simplifie la compréhension des alignements. C'est un logiciel graphique open-source, écrit en Java, conçu pour la visualisation, l'annotation et l'analyse interactive des alignements de séquences multiples (Fig. 10). Michele Clamp et son équipe ont lancé ce projet la première fois en 1996, puis Waterhouse et ses collègues ont poursuivi le développement de Jalview Version 2 qui comporte plusieurs fonctionnalités avancées (**Waterhouse et al., 2009**). Jalview se distingue par sa capacité à prendre en charge tout un processus d'alignement, de sa création à son édition manuelle, incluant l'annotation structurale et fonctionnelle, l'élaboration d'arbres phylogénétiques (NJ, UPGMA), l'examen statistique de la conservation (consensus, PCA), et même la réalisation de figures haute définition destinées à la publication. Jalview prend en charge les formats majeurs (FASTA, CLUSTAL, STOCKHOLM, MSF) et offre la possibilité d'importer et d'exporter divers types de fichiers du projet. À ce jour, Jalview reste un élément central dans le domaine de la bioinformatique moléculaire.

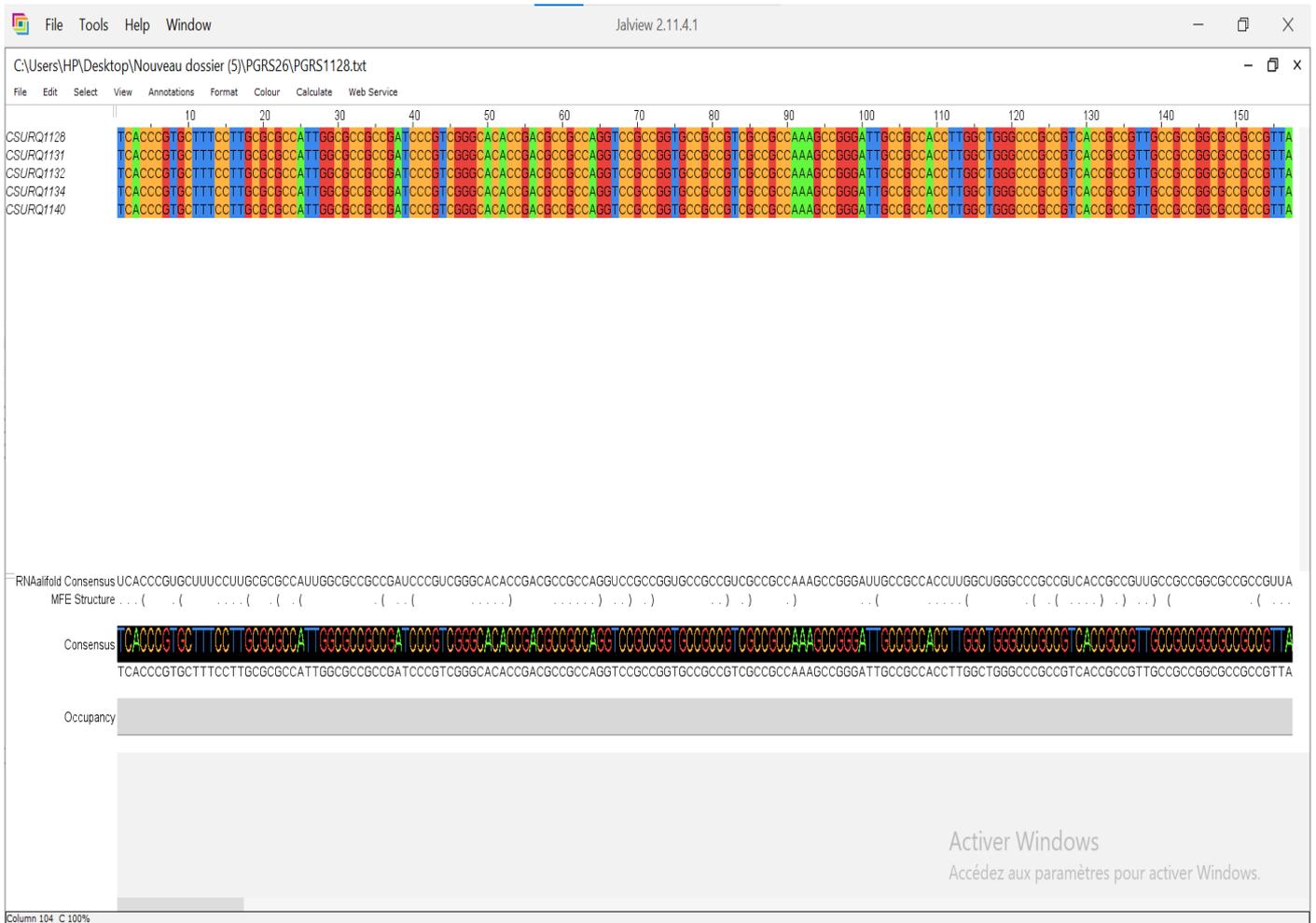


Figure 10: Interface du programme Jalview (v2.11.4.0)

II.2.4. Plateforme phylogeny.fr :

Pour effectuer l'analyse phylogénétique, nous avons utilisé la plateforme web Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr>), développée par Dereeper et al. (2008) (Fig. 11). A l'aide de l'outil "A la carte" qui permet de sélectionner et paramétrer individuellement chaque étape d'analyse. Le site nous permet de générer une curation de nos séquences à l'aide de **Gblocks 0.91b** dans le but d'améliorer la qualité de l'alignement multiple en éliminant les régions ambiguës, les gaps excessifs et les positions hypervariables qui peuvent fausser les distances phylogénétiques. Les séquences curées ont été extraites pour construire l'arbre phylogénétique au moyen du logiciel **Mega 11**.

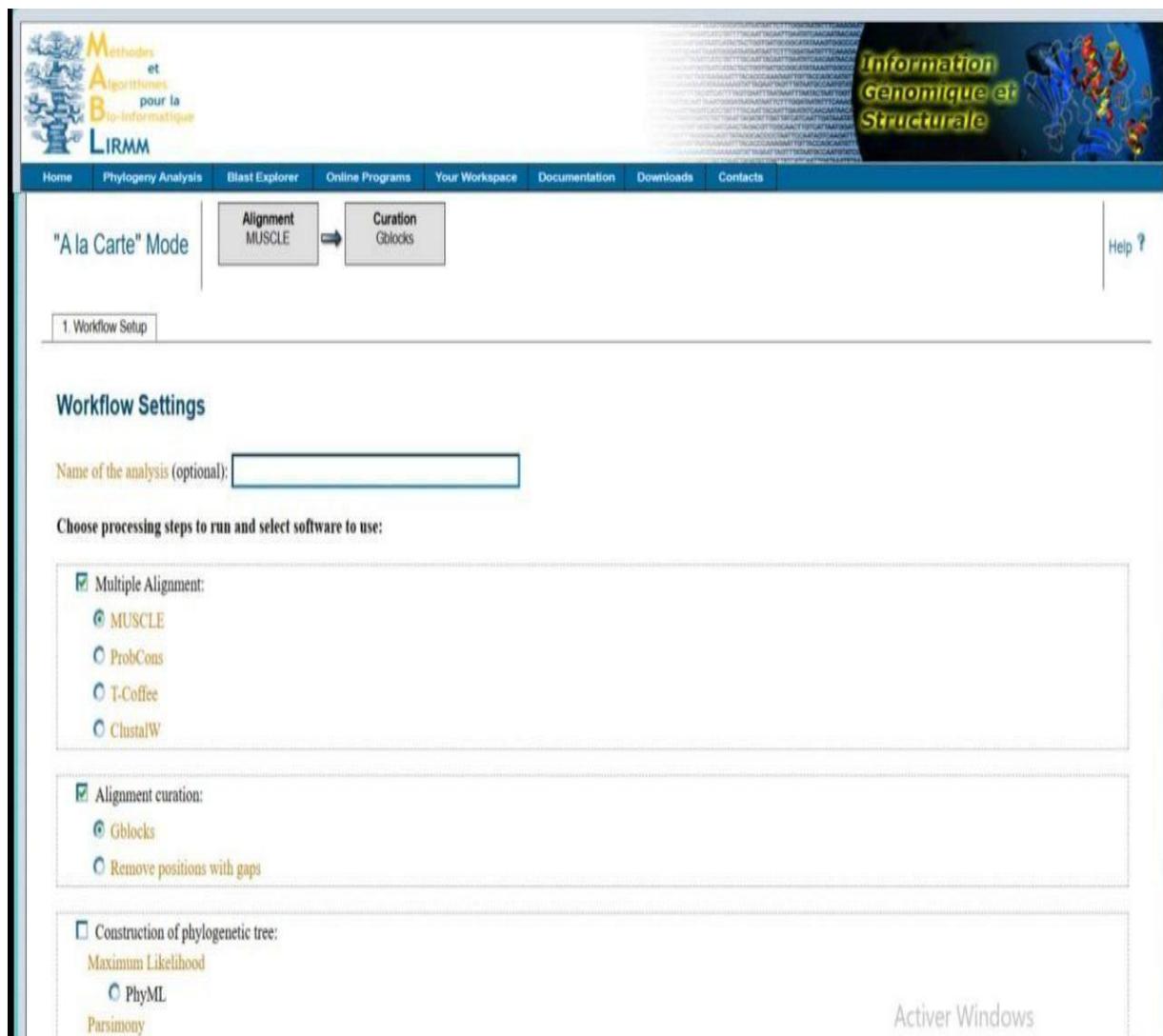


Figure 11: Interface de la plateforme phylogeny.fr

II.2.5. MEGA v11.0.13 :

Un logiciel utilisé pour la construction et la visualisation de l'arbre phylogénétique à partir d'un fichier curé à l'aide de la méthode d'analyse Neighbor-joining avec les paramètres suivants : 1 000 bootstrap, p-distance comme modèle de substitution et 3 threads. C'est un programme de bioinformatique créé par Tamura et al. (2021), qui est couramment utilisé dans le domaine de l'analyse phylogénétique et de la génétique évolutive permettant de réaliser l'ensemble des analyses nécessaires à l'étude de l'évolution moléculaire, à partir de l'alignement des séquences jusqu'à la visualisation des arbres phylogénétiques. MEGA 11 intègre de nombreux algorithmes de reconstruction phylogénétique incluant les méthodes de distance (Neighbor-Joining, UPGMA) et de maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) .Il offre aussi des outils avancés tels que l'évaluation des distances évolutives, le calcul du taux de substitution, ...etc.

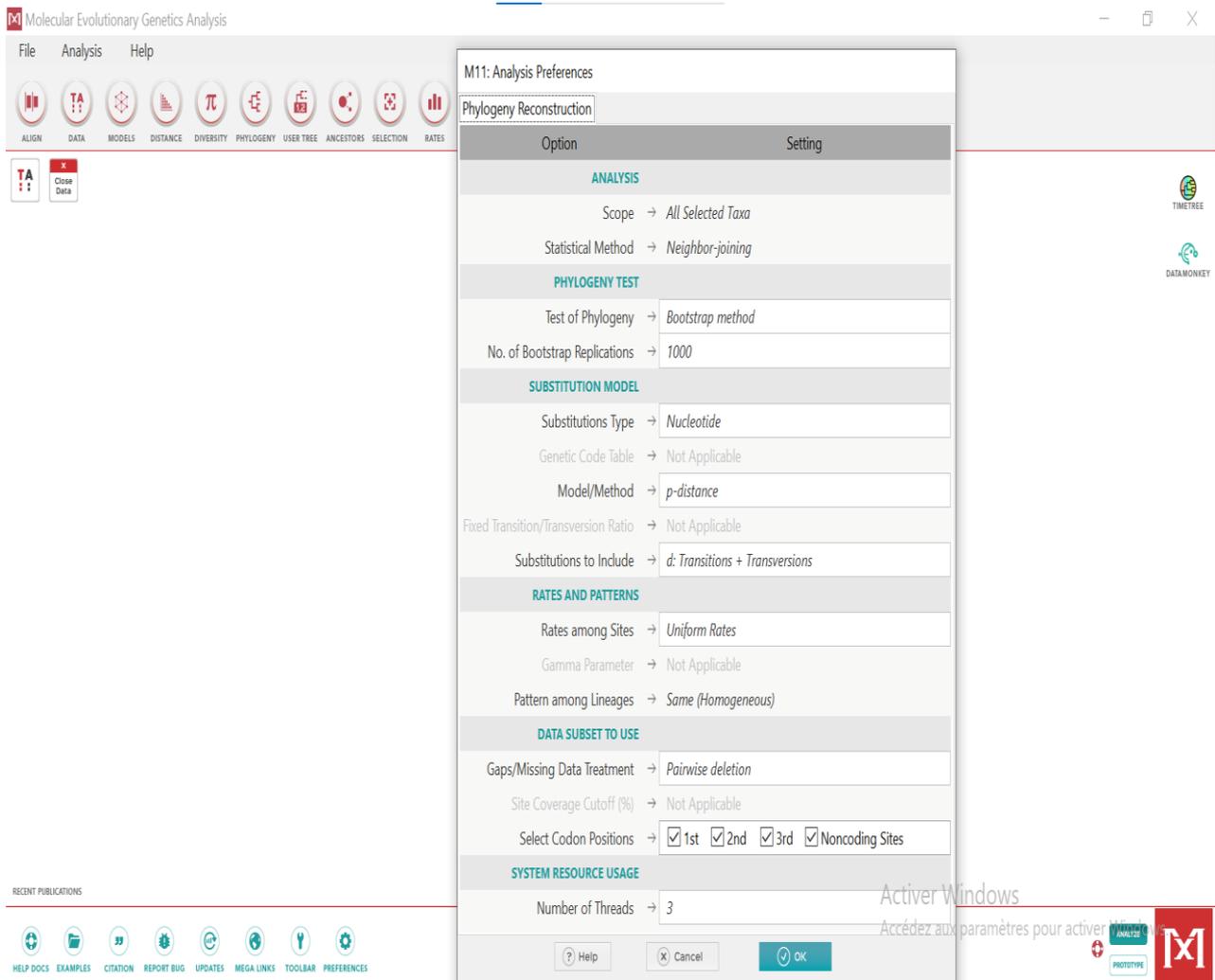


Figure 12: Interface du logiciel Mega11 (v11.0.13)

II.3. Alignement multiple :

- **Le choix du gène rpoB :**

Notre attention s'est portée sur le gène rpoB, codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase, une enzyme cruciale pour la transcription de l'ADN en ARN chez les bactéries. Des mutations dans la région RRDR sont souvent liées à un processus de résistance à la rifampicine, en perturbant l'attachement de la rifampicine à l'ARN polymérase, rendant ainsi le traitement inefficace. Dans le contexte de cette étude l'analyse du gène rpoB vise à :

- Identifier et caractériser les mutations présentes au niveau de la région RRDR du gène rpoB.
- Comparer ces mutations avec des profils de référence des souches sensibles et résistantes.

II.3.1. La récupération des séquences du gène rpoB :

Pour commencer notre recherche sur le gène rpoB, nous avons obtenu le numéro du BioProject PRJEB37177 (le projet de séquençage des souches MB algériennes) à partir de l'article de Tazerart et al, 2021, cité dans la section 'Results'. Par la suite, nous avons accédé à la plateforme NCBI et sélectionné l'onglet génome dans le menu « Ressources populaires ». Suite à l'affichage de la base de données Génome, nous avons entré le numéro de projet dans le champ de recherche approprié. Les résultats identifiés présentaient 13 souches de *M. bovis*, parmi lesquelles nous avons choisi 5 souches Q1128, Q1131, Q1132, Q1134 et Q1140, de différents génotypes. Pour chacune de ces cinq souches, nous avons accédé aux données d'assemblage du génome et nous avons consulté la rubrique « voir les gènes annotés ». A l'aide de l'outil de recherche basé sur le mot-clé : rpoB, nous avons pu s'acquérir de l'emplacement génique, la direction de la séquence, le nom, le symbole, le locus tag, le type de gène, la protéine ainsi que la longueur de la séquence en acides aminés du gène. Les séquences nucléotidiques complètes du gène ont été obtenues et téléchargées en format FASTA. Chaque séquence a été renommée selon le nom de la souche d'origine afin de faciliter les alignements. Ces séquences ont ensuite été regroupées dans un seul fichier FASTA pour permettre l'alignement multiple (Fig. 13).

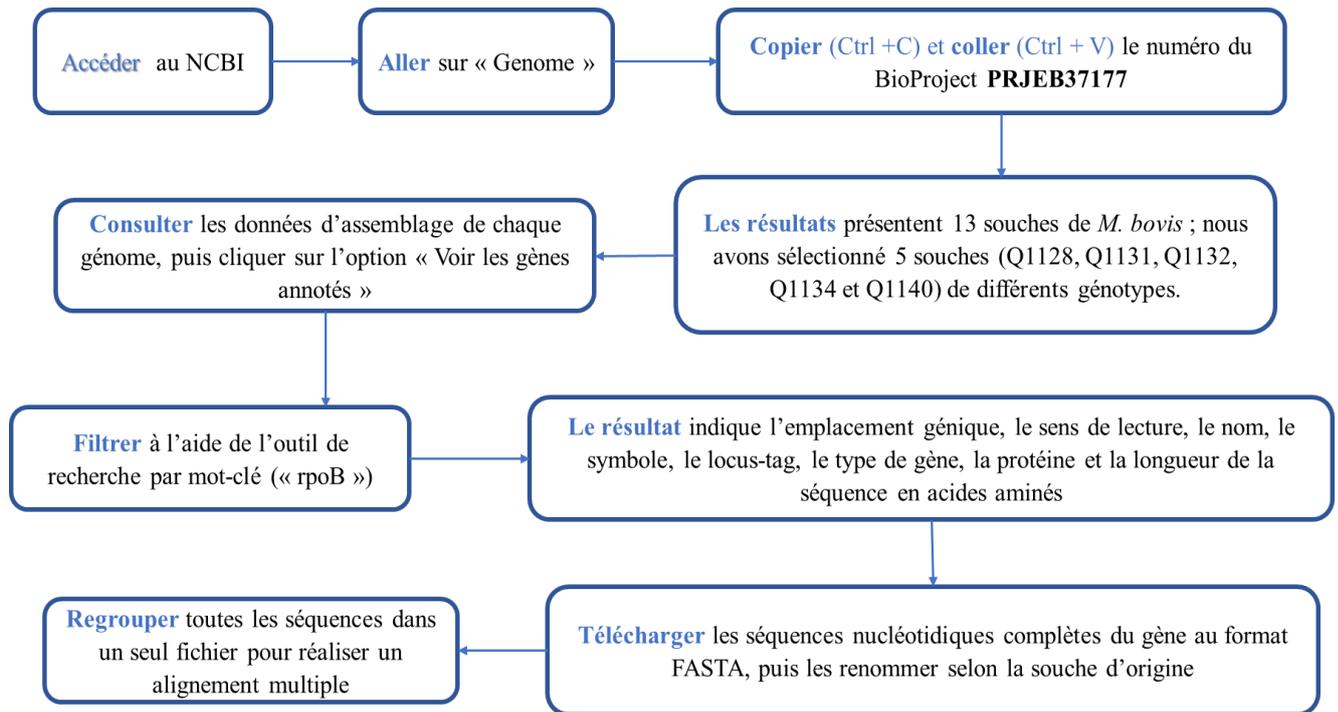


Figure 13:Diagramme explicatif des entrées réalisées pour l'obtention des séquences du gène rpoB des souches M. bovis isolé en Algérie.

II.3.2. Alignement du gène rpoB :

L'objectif de l'alignement est d'identifier les mutations spécifiques du gène rpoB liées à la résistance à la rifampicine de *M. bovis* provenant de bovins en Algérie (Tazerart et al, 2021) entre elles ainsi qu'avec celles isolées dans diverses régions géographiques et en les comparant également avec des souches de *M. bovis* issues des cas cliniques en Égypte et au Ouganda.

II.3.2.a) Souches égyptiennes :

Une étude égyptienne intitulé «Genetic diversities and drug resistance in *Mycobacterium bovis* isolates from zoonotic tuberculosis using whole genome sequencing» de Soliman et son équipe publiée en 2024 a été sélectionné pour comparer les isolats des cas cliniques avec les souches algériennes isolées du bovin. Tout d'abord, nous avons extrait le numéro du BioProject PRJNA1019495. Nous avons utilisé la plateforme NCBI ainsi que la base de données Génome pour obtenir les séquences du gène rpoB, suivant le même procédé utilisé pour la récupération des gènes rpoB des souches algériennes. Les résultats obtenus montrent que 55 génomes séquencés représentent les espèces *M.Tuberculosis* et *M.bovis*. Nous avons sélectionné trois souches de *M.bovis* (S20, S23 et TB1). Il est aussi mentionné dans l'étude égyptienne que la souche TB1 présente une résistance à la rifampicine, tandis que deux autres S20 et S23 sont sensibles.

Les séquences ont été ensuite assemblées dans un seul fichier sous format FASTA (tableau V).

Tableau V: Séquences du gène *rpoB* étudiées de souches prélevées chez l'Homme

BioProject	BioSample	Souche	Hôte	Pays
PRJNA1019495	SAMN38024412	TB1	Homo sapiens	Egypte
	SAMN37519964	0023		
	SAMN37519961	0020		
PRJNA233394	SAMN02567762	B2 7505	Homo sapiens	Ouganda

II.3.2.b) Souche de Ouganda

Nous avons examiné une recherche ougandaise intitulée ‘Retrospective Analysis of Archived Pyrazinamide Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Uganda—Evidence of Interspecies Transmission’ réalisée par Wanzala et al en 2019 qui présente un cas clinique atteint par *Mycobacterium bovis* ou cet isolat était résistant à tous les antibiotiques antituberculeux. Nous avons d’abord identifié le numéro de BioProject correspondant (PRJNA233394). Ce numéro a été consulté sur la plateforme en ligne du NCBI ainsi que dans la base de données ‘Génome’, ce qui nous a permis d’accéder aux données génomiques associées. La séquence du gène *rpoB* issue de la la souche B2 7505 a ensuite été extraite en suivant un protocole identique à celui appliqué pour les souches algériennes, téléchargée au format FASTA, et enfin renommée en fonction du nom de la souche et de son origine (Cf. tableau V).

II.3.2.c) Souches provenant de différentes zones géographiques :

Dans le cadre de cette étude, et pour améliorer la précision et la représentativité des résultats d'alignement, nous avons recherché les séquences du gène *rpoB* des souches issues de régions différentes dans la base de données NCBI. Nous avons rassemblé un lot de séquences pour confronter les mutations détectées dans la zone RRDR avec des profils de référence. Certaines séquences ont pu être obtenues directement à partir des pages d'annotation génomique complètes suivant les mêmes étapes mentionnées précédemment, où le gène *rpoB* était explicitement identifié et annoté. Cependant, pour d'autres souches, en particulier celles pour

lesquelles seuls des génomes WGS étaient disponibles, le gène *rpoB* n'était pas spécifiquement annoté. Devant cette situation, on a dû procéder à une recherche manuelle du gène dans les contigs, en recourant à des outils tels que BLASTn pour identifier et extraire la séquence nucléotidique du gène. Les séquences récupérées ont par la suite été enregistrées en format FASTA, nommées d'après leur origine géographique ou leur identifiant de souche, et réunies dans un même dossier pour l'étape d'alignement (tableau VI).

Tableau VI: Origine des séquences du gène *rpoB* étudiées isolées du bovin.

BioProject	BioSample	Souche	Hôte	Pays
PRJEB37177	SAMEA6617080	CSURQ1128	Bovin	Algérie
	SAMEA6617082	CSURQ1131		
	SAMEA6617083	CSURQ1132		
	SAMEA6617085	CSURQ1134		
	SAMEA6617090	CSURQ1140		
PRJEB15187	SAMEA20450668	AF2122/97	Bos Taurus	Royaume-Uni
PRJNA756983	SAMN21018175	TMT05	Bovin	Brésil
PRJNA428763	SAMN08321034	2002/0476	Bos Taurus	Canada
PRJNA1194337	SAMN45177730	L24001	Bos Taurus	Chine
PRJEB33636	SAMEA5803801	Mb3601	Bovin	France
PRJNA412319	SAMN07709478	3/86R	Bovin	Inde
PRJNA287158	SAMN06627641	MbURU-016	Bos Taurus	Uruguay

Le programme BioEdit a été utilisé pour effectuer un alignement multiple avec l'algorithme ClustalW. Nous avons conservé les paramètres par défaut afin d'identifier les mutations présentes dans la région RRDR :

- Le fichier contenant les séquences des souches algériennes en format FASTA a été importé dans le programme BioEdit via l'option « **open sequence set** » afin de charger

les séquences. Après l'ouverture des séquences dans l'éditeur, nous avons effectué un alignement multiple en utilisant l'outil ClustalW intégré (disponible sous « **Accessory application -> alignement multiple ClustalW** »). Les paramètres par défaut ont été appliqués, ce qui a conduit à un alignement automatique de toutes les séquences. Par la suite, l'alignement réalisé a été examiné manuellement en utilisant les outils de visualisation de Jalview afin d'identifier toute variation nucléotidique ou mutations spécifiques parmi les différentes souches analysées.

- Un autre fichier contenant des séquences de rpoB issue de l'étude égyptienne additionné de la souche de Ouganda et un autre regroupant d'autres issues de différentes zones géographiques ont été téléchargé vers le programme Bioedit (séparément). En cliquant sur l'option "**alignement multiple ClustalW**" nous avons réalisé l'alignement entre les séquences, et pour la visualisation de l'alignement nous avons utilisé le programme Jalview.

II.4. Analyse phylogénétique :

- **Le choix du gène PGRS26 pour créer un arbre phylogénétique :**

Dans une étude effectuée en 2003 par l'équipe de Garnier et al, une comparaison a été réalisée entre le génome entier de la souche de référence *M. bovis* AF2122/97 à celle de *M. tuberculosis* H37Rv qui a montré que malgré une identité génomique globale supérieure à 99,95%, plusieurs gènes PE-PGRS notamment PE_PGRS26 présentent des indels (délétions et insertions) spécifiques à *M. bovis*. Ces protéines représentent des structures de surface ou d'antigénicité. De plus une autre étude faite par l'équipe de Dheenadhayalan et Brennan en 2006 dans le but d'évaluer la variabilité intra-espèce du gène PE_PGRS26 parmi une large collection d'isolats cliniques de MTBC, suggère que le domaine PE est quasi-invariable, reflétant une pression sélective forte, tandis que le domaine PGRS accumule des insertions/délétions qui sont plus prononcées dans les isolats de *M. bovis*. Ainsi, ce gène a été sélectionné dans le cadre de notre étude pour la construction d'un arbre phylogénétique, dans le but d'explorer les relations évolutives entre les souches MTB analysées.

Nous avons également étudié les liens évolutifs entre *M. bovis* et les isolats appartenant au complexe MTB.

II.4.1. Provenance des séquences :

Les gènes PGRS26 des 5 souches de *Mycobacterium bovis* d'origine algérienne, les mêmes choisis pour l'alignement multiple, ont été étudiés. Étant donné que les génomes de ces souches ont été disposés sur NCBI sous forme de contigs, pour détecter le gène, nous avons

téléchargé la séquence de PGRS26 de la souche *Mycobacterium bovis* de référence (AF2122/97) de NCBI. Par la suite, nous avons aligné les génomes des souches algériennes pour qu'on puisse récupérer les séquences PGRS26 de la plateforme BLAST à l'aide de l'outil « Align two or more sequences ».(Tableau II , Annexe)

Pour l'étude du gène au sein du complexe MTB, nous avons récupéré les séquences du gène PGRS26 issu de différentes espèces du complexe tel que *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* et *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* et *M. mungi* depuis la base de données NCBI. Par la suite, nous avons téléchargé ces séquences sous forme FASTA et renommé chaque séquence par un numéro d'accèsion, l'origine géographique, l'année d'isolement et le gène. (Tableau II, Annexe)

II.4.2. Alignement multiple et génération de la séquence consensus :

Nous avons réalisé un alignement multiple des séquences de PGRS26 récupérées depuis BLAST sur le programme Bioedit par l'algorithme ClustalW pour générer une séquence consensus. Cette étape n'a pas été réalisée pour l'étude au sein du MTBC.

II.4.3. Recherche des séquences homologues sur BLAST :

La séquence consensus a été déposée dans le champ « Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) » dans la plateforme BLAST, puis on a choisi la base de données « Nucleotide collection (nt) » et pour le choix de l'organisme on a entré l'espèce *Mycobacterium bovis*. Nous avons choisi l'option « Highly similar sequences (megablast) » avec le reste des paramètres par défaut. Plusieurs séquences ont été obtenues après le lancement de BLAST et 13 séquences de *M.bovis* ont été sélectionnées présentant une homologie entre 94.94% et 99.93%.

Afin d'enrichir notre arbre phylogénique nous avons téléchargé plusieurs génomes de souche *M.bovis* provenant de différentes zones géographiques (Uruguay, Brésil, Argentine, ...) sous forme de contigs. A l'aide de l'outil « Align two or more sequences », nous avons déposé la séquence consensus dans le premier champ et le génome des souches dans le deuxième champ avant de lancer le BLAST. Les résultats montrent que la séquence PGRS séquencée est retrouvée dans différents contigs, En conséquence, nous avons téléchargé les séquences retenues et puis à l'aide du programme Bioedit, nous avons assemblé ces séquences manuellement pour obtenir le gène de PGRS26 complet. A la fin, on a collecté toutes les séquences de PGRS26 dans un fichier sous format FASTA.

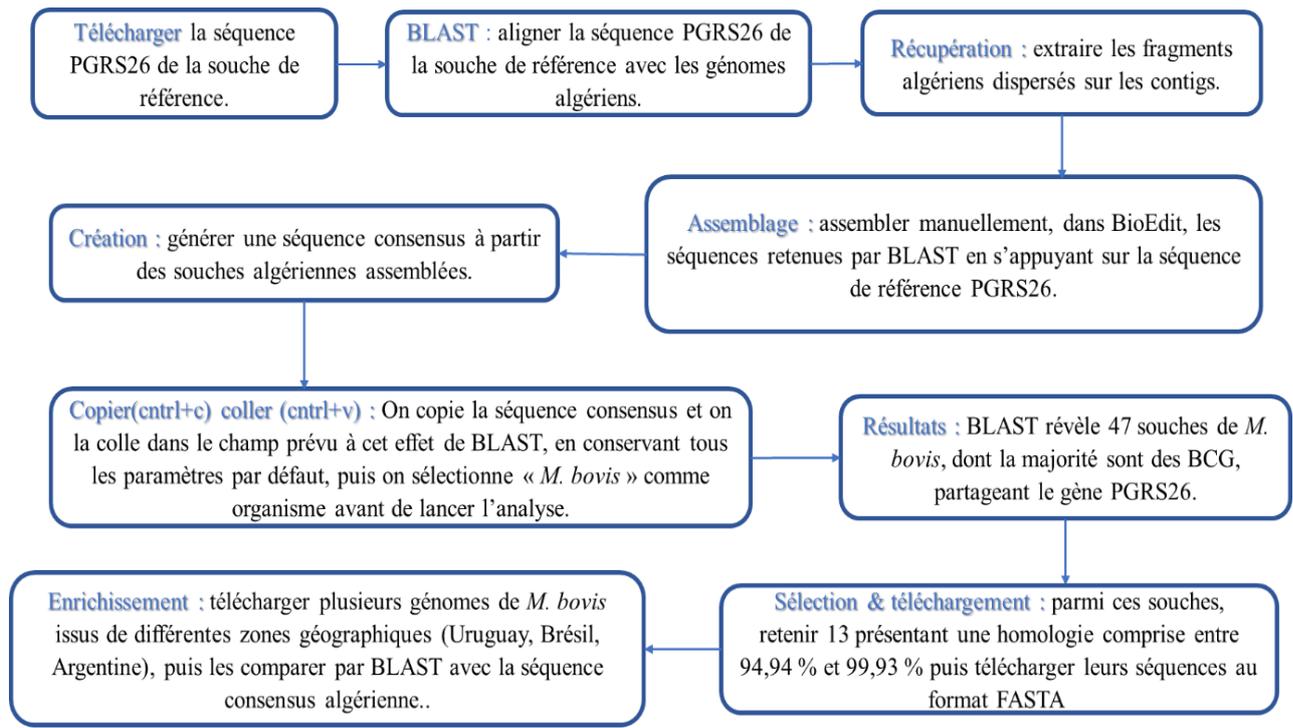


Figure 14: Diagramme explicatif des entrées réalisées pour l'obtention des séquences du gène PGRS26 de la souche M.bovis

II.4.4. Construction de l'arbre phylogénétique :

Sur la plateforme **phlogeny.fr**, nous avons sélectionné l'option **A la Carte** dans la catégorie **phylogeny analysis**. On a téléversé les séquences sur le champ en incluant les séquences algériennes, les séquences retenues de BLAST, les séquences de PGRS26 assemblées manuellement et la séquence de référence (AF2122/97). L'alignement est lancé en amont de la curation avec l'algorithme **GBlocks 0.91b**, sans modification dans les paramètres. Par la suite, on télécharge les séquences curées sous la forme FASTA (Fig. 13 et 15).



Curation results



Figure 1: Selected alignment blocks (underlined in blue).

Activer Windows
 Accédez aux paramètres pour activer Windo

Input:

Figure 15: Interface de Gblocks après la curation des séquences PGRS26 sur la plateforme phylogeny.fr

II.4.5. Édition et visualisation de l'arbre sur MEGA 11 :

Les séquences curées générées par **phylogeny.fr** ont été ouvertes avec le logiciel **MEGA11** en optant pour la phylogénie Neighbour-Joining dans la catégorie <Phylogeny> disponible sur l'interface du logiciel. Les paramètres sélectionnés sont ceux décrits dans la page XX. Les souches présentes dans l'arbre sont identifiées par un numéro d'accession, l'origine géographique, l'année d'isolement et le gène. Une fois l'arbre généré, nous avons pensé à modifier la longueur des branches et à marquer les souches algériennes et la souche de référence afin de faciliter la lecture. L'arbre modifié a été téléchargé sous trois formats différents : PDF, EMF et SVG (Fig. 15 et 16).



Figure 16: Interface du logiciel MEGA11 lors de la création d'un arbre phylogénétique.

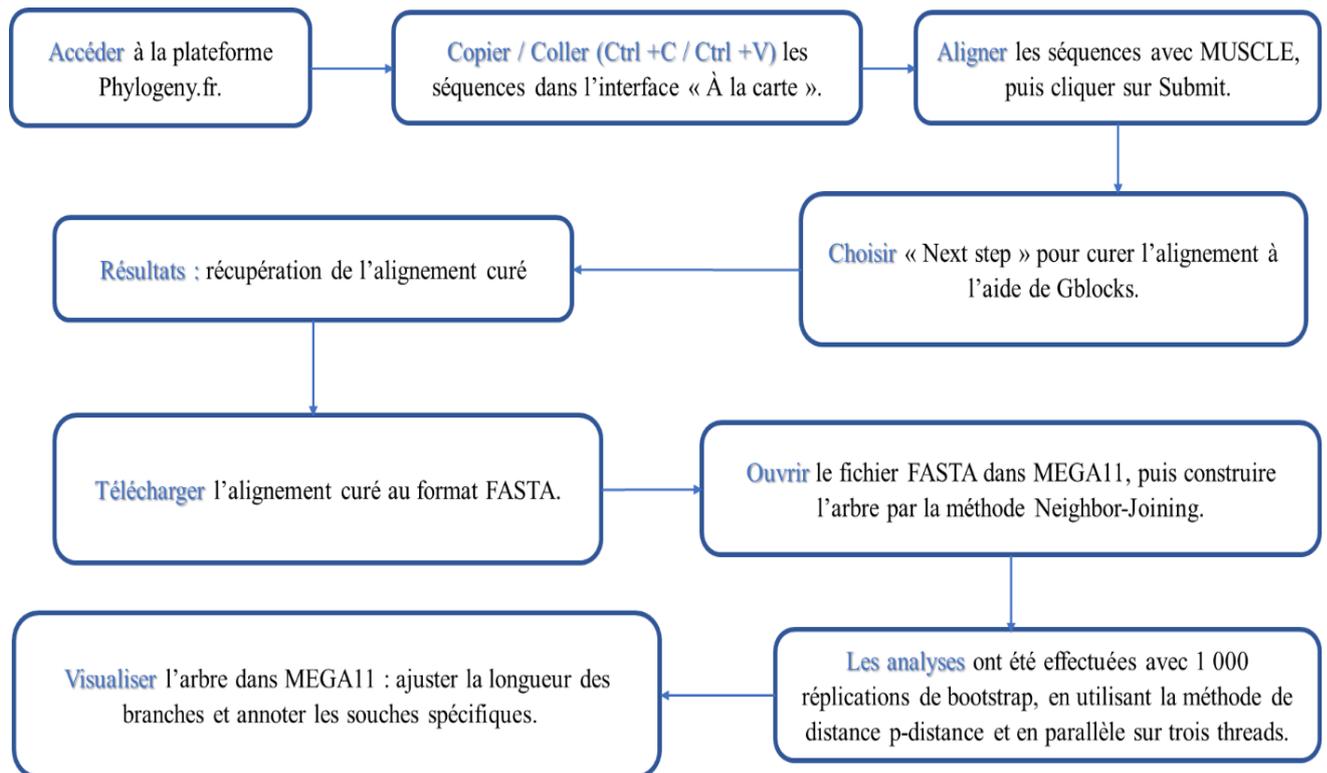


Figure 17:Diagramme explicatif montrant la construction de l'arbre phylogénétique en utilisant la plateforme phylogeny.fr et le logiciel MEGA11

Chapitre III

Résultats et

Discussion

III. Résultats et Discussion

III. 1. Alignement multiple

III.1.1. Alignement des séquences du gène rpoB des souches algériennes :

L'alignement multiple par le programme Bioedit (grâce à l'algorithme ClustalW) du gène rpoB présent chez *Mycobacterium bovis* isolé des bovins algériens, montre une identité totale de 100% sur la totalité des positions alignées (visualisation sur Jalview sur la figure 18).

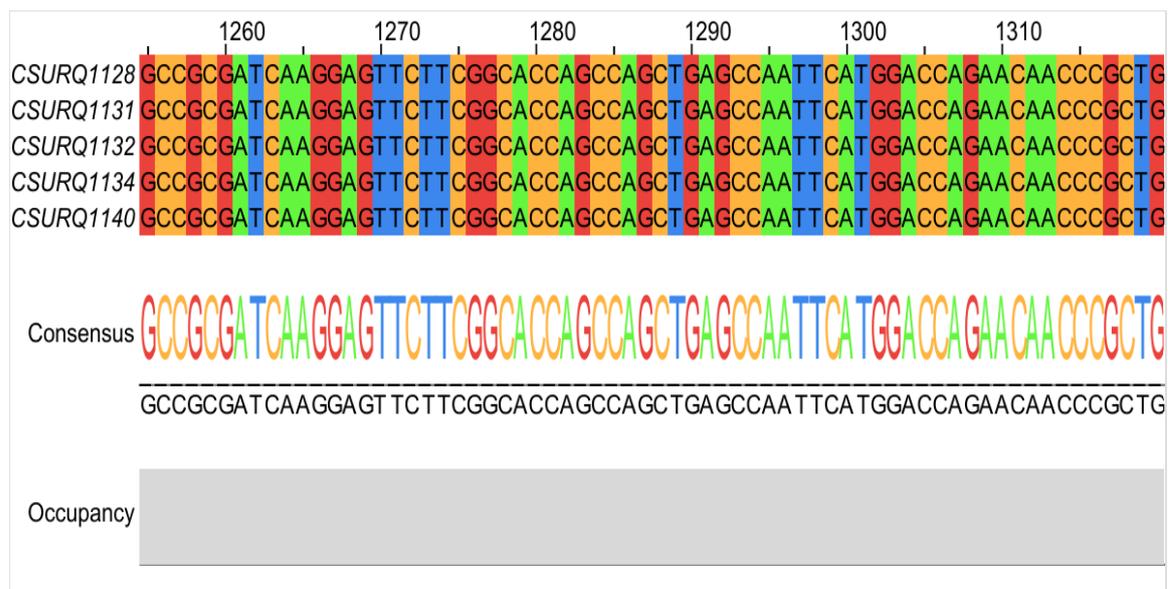


Figure 18: Alignement multiple des cinq séquences rpoB de *Mycobacterium bovis* isolées des bovins en Algérie.

Dans cette étude, nous avons caractérisé *in silico* la région codante du gène rpoB. Le gène rpoB, codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, une enzyme essentielle à la transcription de l'ADN en ARN. La sous-unité β est une cible majeure de la rifampicine. Les mutations dans ce gène altèrent l'affinité de liaison du médicament, conduisant à une résistance. Environ 95 % des résistances à la rifampicine sont associées à des mutations dans la région appelée RRDR (Rifampicin Resistance-Determining Region).

L'alignement initial des cinq souches algériennes entre elles, réalisé via BioEdit, n'a révélé aucune divergence significative, indiquant une forte conservation du gène rpoB dans les souches *M. bovis* sélectionnées. Cet alignement reflète l'homogénéité de ces isolats issus d'élevages des wilayas de Blida et Médéa qui adoptent la stratégie d'abattage préconisée par l'OMS, c'est-à-dire l'abattage immédiat des bovins atteints de tuberculose avant l'apparition potentielle de variants résistants. Cette approche préventive réduit l'exposition des souches

bactériennes à la rifampicine. Ces animaux sont retirés de la population avant l’initiation de tout protocole thérapeutique. C’est grâce à cette procédure que les populations de *M. bovis* isolé du bovin restent sensibles à la rifampicine et conservent une stabilité génétique.

III.1.2 Alignement du gène *rpoB* avec d’autres séquences de différentes zones géographiques :

D'autres séquences du gène *rpoB* des souches isolées du bovin tel que le gène de la souche de référence et d’autres séquences provenant de différentes zones géographiques ont été également alignées pour identifier d’éventuelles mutations chez le gène. L’alignement multiple de ces séquences montre une identité nucléotidique de 100% sur l’ensemble des positions alignées (visualisation sur Jalview sur la figure 19).

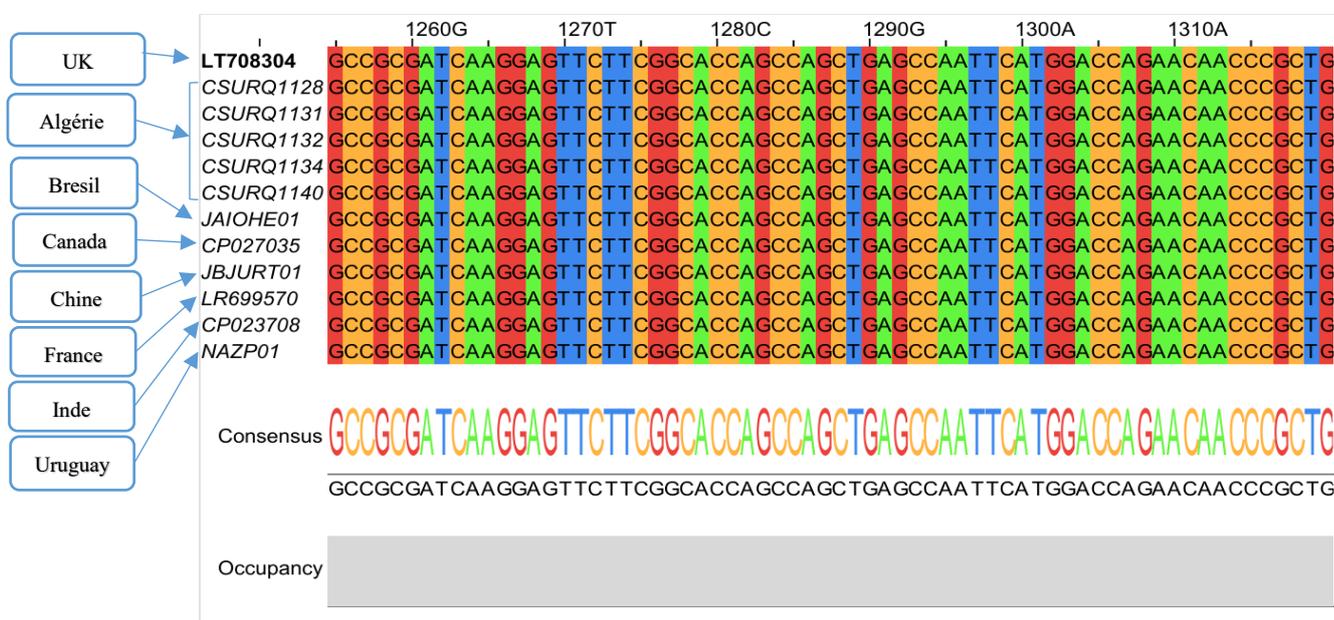


Figure 19: Alignement multiple de gène *rpoB* de *M. bovis* isolé de la souche de référence et d’autres séquences de différentes zones géographiques.

L'absence d’une variabilité génétique dans les séquences algériennes du gène *rpoB* dans la région RRDR confirmée par une comparaison avec la souche de référence AF2122/97 et des séquences issues de diverses régions géographiques, suggère une forte conservation interrégionale observée dans le gène *rpoB* chez les souches de *M. bovis*. Cette conservation du gène pourrait refléter une origine phylogénétique commune récente ou le résultat des mesures strictes appliquée chez le bovin en cas de tuberculose (la stratégie d'abattage lors d'une infection par *M. bovis* et l'absence de traitement par l'antibiotique). Dans une étude française réalisée par Appegren et al, publiée en 2023, ils ont utilisé des méthodes de génotypage (Spoligotypage,

MIRU-VNTR) pour identifier et caractériser les souches de *M. bovis* entre 2000 et 2010. Ils ont démontré que la stabilité génétique du gène *rpoB* chez *M. bovis* en France indique une adaptation optimale aux réservoirs bovins, où l'absence de traitement antibiotique et l'éradication par abattage sanitaire maintiennent une pression évolutive minimale (**Appegren et al, 2023**). Cette observation est particulièrement intéressante quand on la compare aux données de *M. tuberculosis* où des mutations telles que S450L ou H445Y sont liées à une résistance élevée, mais l'ARN polymérase conserve sa fonctionnalité grâce à une flexibilité conformationnelle (**Li et al, 2021**).

III.1.3. Alignement multiple du gène *rpoB* isolé du bovin avec d'autres isolés de l'Homme :

Des séquences du gène *rpoB* des souches *M.bovis* isolées chez l'humain dont trois séquences d'origine égyptienne et une séquence provenant de l'Ouganda ont été alignées avec les séquences du gène *rpoB* des souches algériennes étudiées. L'alignement multiple de ces séquences a révélé que deux isolats humains égyptiens (0023,0020) ont une correspondance de séquence de 100% avec les séquences algériennes. Cependant, le troisième isolat humain de la même étude (TB1) indique une similitude de 99.89% dont deux mutations localisées dans la région hotspot. La première est une délétion d'un codon (c .1288_1290del) et la deuxième est une substitution à la position 1303 (p.1303 G>C) ce qui donne l'acide aminé histidine au lieu de l'aspartate. D'autre part l'isolat provenant de L'Ouganda (B2 7505) révèle une ressemblance nucléotidique de 99.97% dont une mutation située dans la région hotspot du gène *rpoB* a la position 1303 (p.1303 G>T) ce qui donne l'acide aminé tyrosine au lieu de l'aspartate.

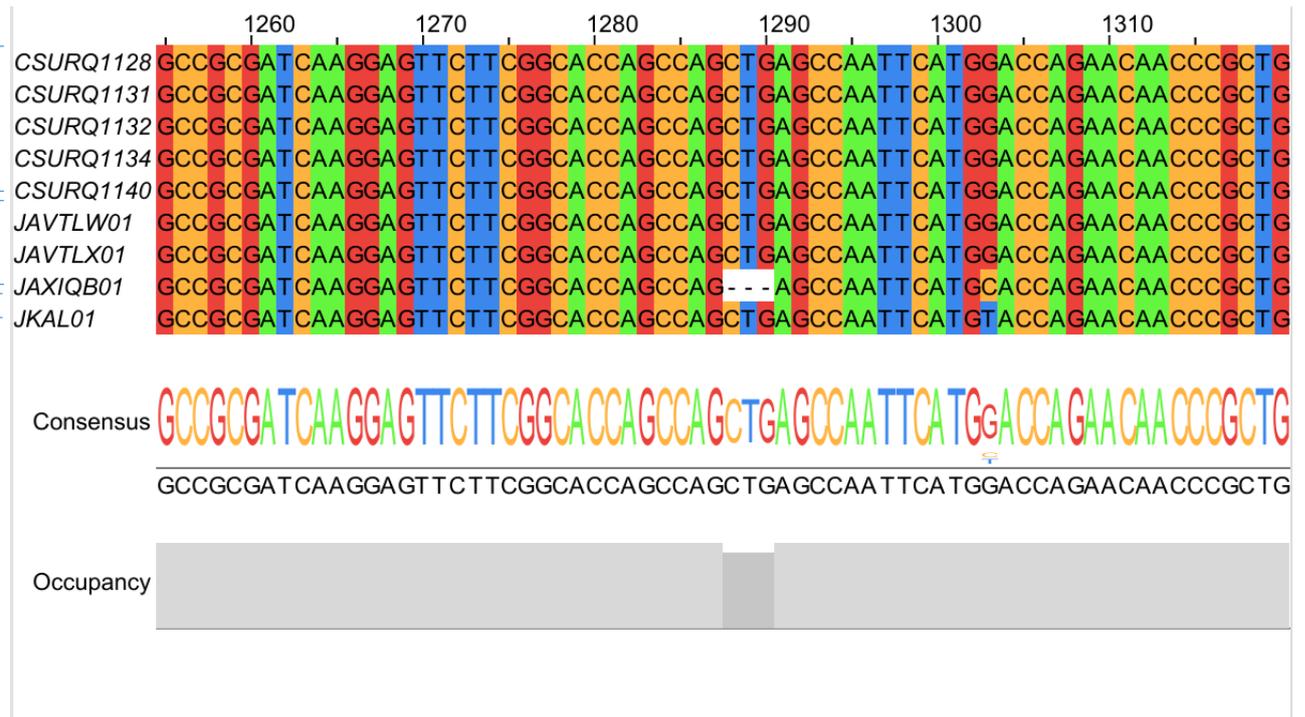


Figure 20: Alignement multiple de gène rpoB de *M. bovis* des souches algériennes avec ceux des isolats humains

L'alignement de ces séquences avec les isolats algériens montre une identité parfaite (100%) entre deux séquences égyptiennes et les cinq séquences algériennes, tandis que la troisième séquence et la séquence ougandaise présentent des mutations dans la région RRDR, dont le codon (430) pour la séquence égyptienne (TB1) et le codon (435) pour les deux séquences égyptienne (TB1) et ougandaise (B2 7505) selon la numérotation de *M. tuberculosis*. Une étude effectuée en Inde montre que des locus tels que le codon (430,435) dans la séquence rpoB reflète des mutations reconnues comme des déterminants majeurs de résistance à la rifampicine, car elles altèrent le site de liaison de l'antibiotique sur la sous-unité β de l'ARN polymérase (Vadakunnel et al, 2025). Conformément aux observations de l'étude égyptienne, l'identité parfaite observée entre les séquences rpoB des souches bovines algériennes et celles de souches zoonotiques sensibles à la rifampicine isolées en Égypte suggère fortement une origine animale commune ce qui renforce l'hypothèse d'une transmission inter-espèce depuis le bétail.

Les variations identifiées dans le gène rpoB au sein des souches résistantes à la rifampicine sont associées à la pression sélective induite par le traitement antibiotique, leur émergence et leur stabilisation au sein des populations bactériennes sont stimulées par une exposition prolongée ou inappropriée à la rifampicine. Une autre hypothèse serait que la

transmission des souches *M. bovis* résistantes à la rifampicine dans nos alignements peuvent également être d'origine humaine malgré que la transmission interhumaine est considérée comme évènement rare. Une étude sur la transmission de *Mycobacterium bovis* au Royaume-Uni de 2005 à 2008 a révélé que, parmi les 129 isolats identifiés chez des cas cliniques, ils ont trouvé que 9 personnes infectées par *M. bovis* nées après 1960 (lorsque la pasteurisation a été largement adoptée au Royaume-Uni). De plus, aucun des patients n'a été en contact direct avec des animaux sauvages, ce qui suggère une transmission interhumaine récente (**Mandel et al, 2011**). Cette transmission inter-humaine de souches résistantes constitue un enjeu majeur de santé publique.

Des exceptions peuvent être constatées malgré l'absence du traitement, certaines mutations *rpoB* ont été détectées, provoquées par des contraintes indirectes telles que l'utilisation d'antibiotiques non ciblé (traitement d'autres infections), ou la transmission d'homme à l'animal. Une étude égyptienne récente sur l'isolement et la caractérisation de souches de *Mycobacterium bovis* prélevées sur des bovins abattus révèle que parmi six isolats phénotypiquement résistants à la rifampicine, les chercheurs ont identifié trois substitutions ponctuelles dans la région RRDR : à savoir les mutations H526Y, S531L et D516V (selon la numérotation *E. coli*). (**Desouky et al, 2022**). Une autre étude italienne où des chercheurs ont analysés 14 souches de *Mycobacterium bovis* isolées du bovin a confirmé que six souches sont résistantes à la rifampicine grâce au séquençage du gène *rpoB*, et cette résistance est principalement associée à la mutation L521P (**Sechi et al, 2001**).

III.2. Analyse phylogénétique :

II.2.1. Gène PGRS26 chez *M.bovis* :

L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences nucléotidiques du gène PGRS26 basé sur un alignement multiple suivi d'une méthode de type Neighbor-Joining est représenté sur la figure 20. Les séquences incluses dans l'analyse ont été collectées entre 1997-2023. Les valeurs de support statistique, en particulier les bootstraps à 100%, valident la solidité des regroupements constatés. La souche de référence est représentée par le carré bleu LT708304.1 : *M. bovis* (UK/1997/PGRS26). Les résultats révèlent une diversité génétique considérée marquée entre les souches de *Mycobacterium bovis* isolées en Algérie et celles issues d'autres régions du monde dont deux clades principaux ont été identifiés (Fig. 21, 22).

Le premier clade est un groupe monophylétique ancestral qui regroupe la souche de référence *M. bovis* (UK/1997/PGRS26) avec des souches isolées en Irlande en 2021 (Mutant *M. bovis*/Irlande/2021) ainsi que d'autres isolées en Argentine en 2009 du bovin (*Bos taurus*). Ces isolats bien que éloignés dans le temps, semblent présenter une certaine stabilité génétique au sein du gène PGRS26 en les comparant à la séquence de référence avec une distance patristique située entre 0 et 10^{-6} pour la souche argentinienne et entre 2×10^{-6} et 5×10^{-6} pour les souches irlandaises (Fig. 19 et 20).

Le deuxième clade présente une diversité géographique et temporelle remarquable, regroupant des souches collectées entre 1986 et 2023 provenant d'Algérie (CSURQ1128, CSURQ1131, CSURQ1132, CSURQ1134 et CSURQ1140), de France, d'Uruguay, du Brésil, d'Inde, de Chine, de Belgique et de Russie. Bien que la majorité de ces souches montrent une conservation du gène PGRS26, elles présentent collectivement une divergence de 9.15×10^{-3} par rapport à la souche de référence ancestrale. Parmi les isolats algériens de bovins (2017), quatre souches (CSURQ1128, CSURQ1131, CSURQ1132 et CSURQ1140) se distinguent par une distance génétique modérée de 9.15×10^{-3} par rapport à la référence, une valeur partagée avec des souches françaises, brésiliennes, indiennes et canadiennes malgré leur éloignement temporel. En revanche, l'isolat algérien CSURQ1134 révèle une divergence accrue de 2.734×10^{-3} , se positionnant à 1.828×10^{-3} des autres souches du clade. Cette tendance à l'éloignement est encore plus marquée chez la souche russe "*M. bovis* BCG" (isolat humain, 2006) qui présente une distance exceptionnelle de 2.776×10^{-3} par rapport à la référence et 1.861×10^{-3} vis-à-vis des autres membres du clade, confirmant son isolement phylogénétique au sein de ce groupe (Fig. 19 et 20). Cette divergence marquée s'explique par le fait que la souche BCG est une

Chapitre III : Résultats et Discussion

forme atténuée et modifiée de *M. bovis*, développée pour être utilisée comme vaccin, a contrario de la souche algérienne CSURQ1134 considérée comme souche "sauvage" retrouvée naturellement chez le bovin.

Le groupe externe comprend la souche *M. ryadhense*, classée parmi les mycobactéries non tuberculeuses, ainsi que d'autres souches telles que *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii* et *M. liflandii*, regroupées au sein du groupe MuMC (pour *Mycobacterium ulcerans*/*M. marinum*). Ces isolats sont à une distance patristique de $5,39 \times 10^{-2}$ du deuxième clade et à $5,68 \times 10^{-2}$ du clade ancestral.



Figure 21: Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène PGRS26 de souches de *Mycobacterium bovis* collectées en Algérie et dans 12 pays entre 1997 et 2023.

A	B	C	D	E
1	LT708304.1 : M.bovis_(UK/1997/PGRS26)	CP025779.1 : M.marinum_(USA/2008/PGRS26)	CP092981.1 : M.marinum_(Chine/2020/PGRS26)	AP017635.1 : M.ulcerans_(Japan/2005/PGRS26)
2	LT708304.1 : M.bovis_(UK/1997/PGRS26)			
3	CP025779.1 : M.marinum_(USA/2008/PGRS26)	0,402534587		
4	CP092981.1 : M.marinum_(Chine/2020/PGRS26)	0,402534587	0,000000000	
5	AP017635.1 : M.ulcerans_(Japan/2005/PGRS26)	0,411427634	0,016777001	0,016777001
6	CP003899.1 : M.liflandii_(USA/2001/PGRS26)	0,413917717	0,019267084	0,019267084
7	CP155055.1 : M.pseudoshottsii_(Grece/2019/PGRS26)	0,414052107	0,019401475	0,019401475
8	CP045092.1 : M.riyadhense_(Arabie_Saoudite/2018/PGRS26)chromosome	0,120429140	0,408036805	0,408036805
9	CP011455.1 : M.bovis_BCG_(Russie/2006/PGRS26)	0,005847502	0,402075023	0,402075023
10	CP133603.1 : Mutant_M.bovis_(Ireland/2021/PGRS26)	0,000048546	0,402583133	0,402583133
11	CP133602.1 : Mutant_M.bovis_(Ireland/2021/PGRS26)	0,000128582	0,402661169	0,402661169
12	CP133601.1 : Mutant_M.bovis_(Ireland/2021/PGRS26)	0,000092379	0,402626966	0,402626966
13	CSURQ1134 : M.bovis_(Algerie/2017/PGRS26)	0,005784569	0,401105608	0,401105608
14	CSURQ1131 : M.bovis_(Algerie/2017/PGRS26)	0,002888653	0,399645934	0,399645934
15	JQEN01000000 : M.bovis_(Argentine/2009/PGRS26)	0,000008628	0,402525959	0,402525959
16	JQEM01000000 : M.bovis_(Argentine/2009/PGRS26)	0,000016592	0,402551178	0,402551178
17	NAZM01000000 : M.bovis_(Uruguay/2015/PGRS26)	0,002888653	0,399645934	0,399645934
18	CP160832.1 : M.bovis_(Canada/2023/PGRS26)	0,002888653	0,399645934	0,399645934
19	CP010332.1 : M.bovis_(Chine/2016/PGRS26)	0,002888653	0,399645934	0,399645934
20	CP117298.1 : M.bovis_(Canada/2022/PGRS26)	0,002888653	0,399645934	0,399645934
21	CP096845.1 : M.bovis_(France/1999/PGRS26)	0,002888653	0,399645934	0,399645934
22	NAZP01000000 : M.bovis_(Uruguay/2015/PGRS26)	0,002888652	0,399645934	0,399645934
23	JAI0HE01000000 : M.bovis_(Bresil/2018/PGRS26)	0,002888652	0,399645934	0,399645934
24	LR699570.1 : M.bovis_(France/2014/PGRS26)	0,002888652	0,399645935	0,399645935
25	CSURQ1132 : M.bovis_(Algerie/2017/PGRS26)	0,002888651	0,399645935	0,399645935
26	CSURQ1128 : M.bovis_(Algerie/2017/PGRS26)	0,002888650	0,399645936	0,399645936
27	CSURQ1140 : M.bovis_(Algerie/2017/PGRS26)	0,002888607	0,399645980	0,399645980
28	CP096842.1 : M.bovis_(France/2011/PGRS26)	0,002888649	0,399645938	0,399645938

Figure 22: Tableau explicatif illustrant les distances patristiques entre les différentes souches de M. bovis, basé sur l'arbre phylogénétique.

II.2.2. Gène PGRS26 chez le complexe MTB :

L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences nucléotidiques du gène PGRS26 issus de différentes espèces du complexe MTB (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. pennipedi*, *M. canneti*, *M. caprea*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. orygis*, *M. mungi* et *M. africanum*) basé sur un alignement multiple du gène étudié suivie d'une phylogénie par la méthode de Neighbour-joining représenté sur la figure 21 Les séquences incluses dans cette analyse ont été collectées entre 1934 et 2023. Leur traitement a été réalisé à l'aide des outils disponibles dans le logiciel MEGA 11, en suivant les mêmes étapes que pour la construction du premier arbre phylogénétique. Les résultats révèlent une séparation claire entre les différentes espèces avec une organisation phylogénétique reflétant à la fois la répartition géographique et l'histoire évolutive des souches appartenant au MTBC.

Le premier groupe, qualifié de clade ancestral, enraciné par la souche de référence *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, isolée chez l'humain aux États-Unis en 1934, rassemble quatre autres souches de la même espèce provenant de différentes régions du monde : Afrique du Sud, Russie, Pérou et l'Inde. Malgré la diversité géographique et temporelle de ces isolats, ils présentent tous une forte similarité au niveau du gène PGRS26, ce qui suggère une certaine conservation génétique. Ce clade comprend également d'autres espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), telles que *M. orygis*, *M. caprae*, *M. bovis* BCG, *M. mungi*, *M. bovis*, *M. canettii* ainsi que *M. africanum*, qui présentent une faible distance patristique entre elle, ce qui est assez remarquable. Bien que ces souches proviennent d'hôtes variés, de continents différents et été collectées à des époques distinctes, elles partagent un profil génétique étonnamment proche du gène PGRS26. Les distances patristiques, entre ces souches et la souche H37Rv restent très faibles, allant de 8×10^{-11} à $4,38 \times 10^{-6}$ pour les *M. tuberculosis*, de 5×10^{-11} à 8×10^{-11} pour *M. orygis*, de $1,3 \times 10^{-10}$ à $2,5 \times 10^{-9}$ pour *M. bovis* BCG, et atteignant $3,91 \times 10^{-8}$ pour *M. mungi*. D'autre part, Les souches de *M. bovis* isolées en Algérie en 2017 révèlent une conservation notable du gène PGRS26 entre elles, avec une faible distance génétique intra-espèce ($3,43 \times 10^{-3}$). Comparées à la souche H37Rv, elles présentent une divergence plus marquée (entre $1,07 \times 10^{-7}$ et 10^{-9}), mais restent très proches de la souche *M. bovis* de référence (LT708304.1), avec une distance de $3,43 \times 10^{-4}$. Du côté de *M. africanum*, trois souches collectées dans des contextes géographiques et temporels très différents [Colombie (2006), Chine (2016) et Gambie (2004)] montrent une stabilité génétique notable. Elles forment une branche courte et peu divergente par rapport à la souche H37Rv, avec une distance patristique de $3,43 \times 10^{-4}$, soulignant une forte cohérence génétique intra-espèce. Ainsi, les isolats de *M. canettii* présentent des profils plus variés. La souche somalienne isolée en 1969 s'éloigne modérément du clade ancestral ($3,44 \times 10^{-3}$), tandis que trois isolats djiboutiens, collectés en 1997, 1999 et 2004, forment un groupe distinct mais relativement homogène. Ceux-ci montrent une forte conservation du gène PGRS26 et une divergence modérée par rapport à H37Rv, avec des valeurs comprises entre $6,87 \times 10^{-3}$ et $6,95 \times 10^{-3}$.

Le deuxième clade comprend quatre souches (*M. tuberculosis*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* et *M. canettii*) qui se distinguent par leur éloignement par rapport au clade ancestral. Parmi elles, une souche de *M. tuberculosis* isolée à Hong Kong en 2012 et une souche de *M. pinnipedii* prélevée en Australie en 1986 forment un groupe distinct, présentant une distance évolutive similaire de $3,67 \times 10^{-1}$. De plus, une souche espagnole de *M. caprae* révèle également une divergence marquée, estimée à $3,60 \times 10^{-1}$, suggérant une évolution indépendante. Par ailleurs,

Chapitre III : Résultats et Discussion

une souche de *M. canettii* isolée à Djibouti en 2003 se caractérise par un éloignement génétique-significatif par rapport aux autres souches de *M. canetti* appartenant au premier clade ancestral, avec une distance patristique de $3,67 \times 10^{-1}$, indiquant une trajectoire évolutive plus singulière.



Figure 23: Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène PGRS26 de souches de *Mycobacterium bovis* et espèces apparentées provenant de différentes régions géographiques

A	B	C	D	E
1	AL124563 : M.tuberculosis(USA1934)PGRS26	HE85708.1 : M.caneffii(Djibouti2003)PGRS26	MMXD0100000 : M.capraei(Espagne1996)PGRS26	MMWB01
2	AL124563 : M.tuberculosis(USA1934)PGRS26			
3	HE85708.1 : M.caneffii(Djibouti2003)PGRS26	0.3677163945		
4	MMXD0100000 : M.capraei(Espagne1996)PGRS26	0.3607146378	0.075728496	
5	CP022578.1 : M.tuberculosis(Hong_Kong2012)PGRS26	0.3674620444	0.0668726522	0.0754740956
6	MMWB0100000 : M.primordii(Australie1986)PGRS26	0.3674620444	0.0668726522	0.0754740956
7	CP014671.1 : M.africanum(Colombie2006)PGRS26	0.0034371674	0.3711637618	0.3641518052
8	CP010394.1 : M.africanum(Chine2016)PGRS26	0.0034371674	0.3711637618	0.3641518052
9	F0203608.1 : M.caneffii(Djibouti2004)PGRS26	0.066872708	0.3660154179	0.3590134612
10	F0203610.1 : M.caneffii(Djibouti1999)PGRS26	0.066872708	0.3660154179	0.3590134612
11	CP005396.1 : M.tuberculosis(Inde2013)PGRS26	0.0000000013	0.3677163945	0.3607146378
12	F0203608.1 : M.caneffii(Djibouti1997)PGRS26	0.066478691	0.3640983661	0.3573874015
13	CP071128.1 : M.tuberculosis(Russie2018)PGRS26	0.000493659	0.3676727375	0.3666707809
14	HE572501.1 : M.caneffii(Somalie1993)PGRS26	0.003402513	0.3640264773	0.3572845207
15	LT08304.1 : M.bovis(UK1997)PGRS26	0.0034371674	0.3711637618	0.3641518052
16	CSUR01134 : M.bovis (Algérie2017)PGRS26	0.0000000012	0.3677163945	0.3607146378
17	CP188692.1 : M.capraei(Chine2023)PGRS26	0.0000000011	0.3677163945	0.3607146378
18	CSUR01131 : M.bovis (Algérie2017)PGRS26	0.0000000010	0.3677163945	0.3607146378
19	FR070601.1 : M.africanum(Gambie2004)PGRS26	0.0034371674	0.3711637618	0.3641518052
20	CP053004.2 : M.organs(Canada1997)PGRS26	0.0000000008	0.3677163945	0.3607146378
21	CP136660.1 : M.organs(Inde2022)PGRS26	0.0000000005	0.3677163945	0.3607146378
22	CP089714.1 : M.tuberculosis(Perou2012)PGRS26	0.0000000008	0.3677163945	0.3607146378
23	CSUR01140 : M.bovis (Algérie2017)PGRS26	0.0000000023	0.3677163945	0.3607146378
24	CP003494.1 : M.bovis_BCG(USA-PGRS26)	0.0000000049	0.3677163945	0.3607146378
25	AM08590.1 : M.bovis_BCG(France1986)PGRS26	0.0000000013	0.3677163945	0.3607146378
26	AM42059.2 : M.bovis_BCG(Besil1925)PGRS26	0.0000000095	0.3677163945	0.3607146378
27	AP010918.1 : M.bovis_BCG(Japan1965)PGRS26	0.0000000250	0.3677163945	0.3607146378
28	CSUR01128 : M.bovis (Algérie2017)PGRS26	0.0000000536	0.3677163945	0.3607146378
29	CSUR01132 : M.bovis (Algérie2017)PGRS26	0.0000001057	0.3677163945	0.3607146378
30	CP040821.1 : M.tuberculosis(Afrique du_sud2008)PGRS26	0.0000002057	0.3677163945	0.3607146378
31	MMXD0100000 : M.caneffii(Djibouti2003)PGRS26	0.0000000005	0.0000000005	0.0000000005

Figure 24: Tableau explicatif montre les distances patristiques entre les souches de complexe MTBC basées sur l'analyse phylogénétique

Conclusion

Conclusion

La présente étude a porté sur la variabilité génétique du gène *rpoB*, impliqué dans la résistance à la rifampicine, chez des souches de *Mycobacterium bovis* isolées en Algérie et l'étude phylogénétique de ces souches à travers la protéine antigénique PGRS26.

L'étude comparative des séquences génétiques dérivées de souches bovines à celles extraites de cas humains (souches zoonotiques), a révélé des divergences génétiques significatives, indiquant une variation dans le profil de résistance à cet antibiotique essentiel pour la thérapie contre la tuberculose. Les analyses ont montré que les souches bovines examinées étaient génétiquement sensibles à la rifampicine, alors que certaines souches humaines présentaient des mutations typiques de résistance. Cette observation renforce l'hypothèse d'une possible évolution distincte entre les hôtes, tout en soulevant des questions de santé publique, notamment en termes de transmission zoonotique et de danger d'apparition de souches résistantes à plusieurs médicaments. Cette caractérisation génétique visant à surveiller la virulence de la bactérie pourrait être une piste pour définir l'origine de la souche *M. bovis* lorsqu'elle est isolée chez l'Homme.

De même, l'étude phylogénétique basée sur le gène PGRS26 est une approche différente des méthodes généralement utilisées (génomome complet, SNP, Spoligotypage...) pour ce pathogène. L'analyse a aidé à examiner la variation génétique entre les différentes souches isolées en Algérie et diverses autres isolées dans le monde avec une grande différence temporelle et géographique. Le premier arbre phylogénétique construit à partir des séquences du gène PGRS26 chez *M. bovis* révèle une diversité génétique marquée entre les souches locales et celles issues d'autres zones géographiques dont deux clades principaux ont été identifiées. Les souches algériennes ont présenté une distance patristique de 9.15×10^{-3} par rapport à la souche de référence, révélant une certaine stabilité génétique de ce gène au sein de l'espèce *M. bovis*. Cependant, la souche CSURQ1134 semble plus éloignée avec une distance de 2.734×10^{-3} de reste des souches algériennes. Le deuxième arbre du gène PGRS26 issu de différentes espèces du complexe MTB révèle une divergence génétique entre les espèces étudiées. La souche de référence *M. tuberculosis H37Rv* forme un groupe ancestral avec d'autres espèces du complexe telles que *M. orygis*, *M. caprae*, *M. bovis BCG* et *M. mungi*. Ce clade présente une forte conservation génétique, malgré la diversité des hôtes, des origines géographiques et des périodes d'isolement. Les souches *M. bovis* isolées en Algérie restent très proches de la souche de référence avec une distance patristique de $3,43 \times 10^{-4}$.

Conclusion

Sur la base des résultats obtenus, la surveillance génétique des souches zoonotiques par des approches bio-informatiques, en particulier pour la détection des mutations associées à la résistance à la rifampicine ainsi que le suivi de l'évolution antigénique des souches *M. bovis*, est de mise dans le cadre d'une stratégie intégrée de santé publique.

En perspective de ce travail, nous proposons l'exploration d'autres gènes d'intérêt afin d'approfondir la compréhension des mécanismes de transmission et de l'évolution de *Mycobacterium bovis* dans un contexte zoonotique. Par ailleurs, une surveillance régulière et ciblée des souches pourrait permettre de détecter précocement les mutations critiques, notamment celles associées à la résistance aux antibiotiques.

Références

Références

1. Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2008b). The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology*, 17(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>
2. Amadio, A., Romano, M. I., Bigi, F., Etchehoury, I., Kubica, T., Niemann, S., Cataldi, A., & Caimi, K. (2005). Identification and characterization of genomic variations between *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* H37Rv. *Journal of clinical microbiology*, 43(5), 2481–2484. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2481-2484.2005>
3. Appegren, A., Boschiroli, M. L., De Cruz, K., Michelet, L., Héry-Arnaud, G., Kempf, M., Lanotte, P., Bemer, P., Peuchant, O., Pestel-Caron, M., Skalli, S., Brasme, L., Martin, C., Enault, C., Carricajo, A., Guet-Revillet, H., Ponsoda, M., Jacomo, V., Bourgoin, A., Trombert-Paolantoni, S., ...Godreuil, S. (2023). Genetic Diversity and Population Structure of *Mycobacterium bovis* at the Human-Animal-Ecosystem Interface in France: "A One Health Approach". *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(4), 548. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040548>
4. Brosch, R., & Guilhot, C. (2015). Les bacilles de la tuberculose bovine. *Médecine/Sciences*, 31(2), 123–126. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153102003>
5. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240082410>
6. Caulfield, A. J., & Wengenack, N. L. (2016). Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of clinical tuberculosis and other mycobacterial diseases*, 4, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2016.05.005>
7. Chaubey, KK, Abdullah, M., Gupta, S., Navabharath, M., Singh, SV (2021). Synthèse, ultrastructure et perspectives des biofilms de *Mycobacterium* en matière de tolérance aux médicaments, d'environnement et de médecine. Dans : Vaishnav, A., Choudhary, DK (dir.), *Microbial Polymers*. Springer, Singapour. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0045-6_19

8. Chen, B., Bajramović, B., Vriesendorp, B., & Spaink, H. P. (2025). Evolution of the PE_PGRS Proteins of Mycobacteria: Are All Equal or Are Some More Equal than Others? *Biology*, 14(3), 247. <https://doi.org/10.3390/biology14030247>
9. Ciriac Charles. Acquisition de nouvelles connaissances génétiques sur les souches de Mycobacterium bovis, circulant en France, par l'approche du séquençage du génome complet. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2022. Français
10. Corner, L., Murphy, D., & Gormley, E. (2010). Mycobacterium bovis Infection in the Eurasian Badger (Meles meles): the Disease, Pathogenesis, Epidemiology and Control. *Journal of Comparative Pathology*, 144(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.10.003>
11. De Maio, F., Berisio, R., Manganelli, R., & Delogu, G. (2020). PE_PGRS proteins of Mycobacterium tuberculosis: A specialized molecular task force at the forefront of host–pathogen interaction. *Virulence*, 11(1), 898–915. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1785815>
12. Desouky SM, Elgedawy AA, Abdel-Moein KA. Bacteriological and Molecular Studies on Mycobacterium bovis in Cattle, with Special Reference to its Antimicrobial Resistance. *International Journal of Veterinary Science*. 2022;12(1):54–59. doi: 10.47278/journal.ijvs/2022.155a. Disponible en ligne : <https://doi.org/10.47278/journal.ijvs/2022.155a>
13. Dumont, Y., Lounnas, M., Carrière, C., Solassol, J., Bañuls, A., & Godreuil, S. (2018). Tuberculose bovine : une maladie globalisée à l'interface homme-animal. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2018(503), 58–63. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(18\)30179-5](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(18)30179-5)
14. Faksri, K., Xia, E., Tan, JH et al. Analyse in silico des régions de différence (RD) du complexe Mycobacterium tuberculosis à partir de lectures de séquences à l'aide de RD-Analyzer. *BMC Genomics* 17 , 847 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3213-1>
15. Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., García, J. S. Y., Morbidoni, H. R., De La Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., & Bigi, F. (2013a). Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*, 4(1), 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.223297>

16. García, E. A., Blanco, F. C., Klepp, L. I., Pazos, A., McNeil, M. R., Jackson, M., & Bigi, F. (2020b). Role of PhoPR in the response to stress of *Mycobacterium bovis*. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 74, 101593. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101593>
17. Gonzalo-Asensio, J., Malaga, W., Pawlik, A., Astarie-Dequeker, C., Passemar, C., Moreau, F., Laval, F., Daffé, M., Martin, C., Brosch, R., & Guilhot, C. (2014). Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11491–11496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406693111>
18. Haddad, N. (2013). Aspects zoonotiques de la tuberculose. *Bulletin De L Académie Vétérinaire De France*, 166(3), 214–220. <https://doi.org/10.4267/2042/51800>
19. Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).
20. Hauer, A. (2015). Étude des souches de *Mycobacterium bovis* à l'origine de foyers de tuberculose bovine en France de 1978 à aujourd'hui : une approche moléculaire et génomique [Thèse de doctorat, Université de Tours]. [Theses.fr. https://theses.fr/2015TOUR4010](https://theses.fr/2015TOUR4010)
21. Heym, B., & Cole, S. (1996). Les mécanismes moléculaires de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. *Médecine Et Maladies Infectieuses*, 26(11), 926–929. [https://doi.org/10.1016/s0399-077x\(96\)80199-5](https://doi.org/10.1016/s0399-077x(96)80199-5)
<https://doi.org/10.1128/JCM.02299-10>
22. Institut IGTP ; centre de recherche biomédicale Catalogne ; Espagne 2021 . <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/un-estudio-del-csic-revela-que-las-infecciones-multiples-son-comunes-en-tuberculosis-multirresistente>
23. Jose Vadakunnel, M., Nehru, V.J., Brammacharry, U. et al. Impact of rpoB gene mutations and Rifampicin-resistance levels on treatment outcomes in Rifampicin-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis* 25, 284 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12879-025-10655-6>

24. Kanabalan, R. D., Lee, L. J., Lee, T. Y., Chong, P. P., Hassan, L., Ismail, R., & Chin, V. K. (2021). Human tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiological Research*, 246, 126674. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>
25. Kao, R., Price-Carter, M., & Robbe-Austerman, S. (2016). Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission. *Revue Scientifique Et Technique De L OIE*, 35(1), 241–268. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2430>
26. Karimi, H., Oudghiri, A., En-Nanei, L., Mzibri, M. E., Laglaoui, A., Chaoui, I., & Abid, M. (2020). Frequency of genomic mutations mediating resistance of Mycobacterium tuberculosis isolates to rifampicin in Northern Morocco. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 62. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062037>
27. karlson ag, lessel ef. mycobacterium bovis nom. nov. international journal of systematic bacteriology 1970; 20:273-282. <https://lpsn.dsmz.de/species/mycobacterium-bovis>
28. Kasir, D., Osman, N., Awik, A., Ratel, I. E., Rafei, R., Kassaa, I. A., Safadi, D. E., Salma, R., Omari, K. E., Cummings, K. J., Kassem, I. I., & Osman, M. (2023). Zoonotic tuberculosis: a neglected disease in the Middle East and North Africa (MENA) region. *Diseases*, 11(1), 39. <https://doi.org/10.3390/diseases11010039>
29. Kasir, D., Osman, N., Awik, A., Ratel, I. E., Rafei, R., Kassaa, I. A., Safadi, D. E., Salma, R., Omari, K. E., Cummings, K. J., Kassem, I. I., & Osman, M. (2023). Zoonotic tuberculosis: a neglected disease in the Middle East and North Africa (MENA) region. *Diseases*, 11(1), 39. <https://doi.org/10.3390/diseases11010039>
30. Koumba Yoya, G. (2010). Synthèse d'analogues cinnamiques : inhibiteurs potentiels contre Mycobacterium tuberculosis (Thèse de doctorat, Université de Toulouse). Université de Toulouse. pp. 21, 25
31. Kpoussou, A. R., Efole, J. R. N., Cadranel, J., Wachinou, A. P., Zougmore, H. T., Nouel, O., Séhonou, J., & Mutumwinka, N. M. (2024). Hepatotoxicity of first-line anti-tuberculosis drugs. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 31(6), 596–600. <https://doi.org/10.1684/hpg.2024.2799>
32. Labie, D. (2003). Le génome des mycobactéries : étude biologique et interprétation évolutive. *Médecine/Sciences*, 19(3), 275–277. <https://doi.org/10.1051/medsci/2003193275>

33. Lagrange, P. H. (1998). Vaccination antituberculeuse par le BCG : historique d'une découverte et de ses controverses. *Médecine/Sciences*, 14(3), 314–319. <https://doi.org/10.1051/medsci/1998143314>
34. Li, M., Lu, J., Lu, Y., Xiao, T., Liu, H., Lin, S., Xu, D., Li, G., Zhao, X., Liu, Z., Zhao, L., & Wan, K. (2021). rpoB Mutations and Effects on Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Drug Resistance, Volume 14*, 4119–4128. <https://doi.org/10.2147/idr.s333433>
35. Mandal, S., Bradshaw, L., Anderson, L. F., Brown, T., Evans, J. T., Drobniewski, F., Smith, G., Magee, J.G., Barrett, A., Blatchford, O., Laurenson, I. F., Seagar, A. L., Ruddy, M., White, P. L., Myers, R., Hawkey, P., & Abubakar, I. (2011). Investigating transmission of *Mycobacterium bovis* in the United Kingdom in 2005 to 2008. *Journal of clinical microbiology*, 49(5), 1943–1950.
36. Mélanie Dubois. Les tuberculoses chez l'animal et l'homme : actualités épidémiologique et diagnostique. *Médecine vétérinaire et santé animale*. 2002.
37. Mohammadi Tashakkori, M., Tebianian, M., Tabatabaei, M., & Mosavari, N. (2016). Production of MPT-64 recombinant protein from virulent strain of *Mycobacterium bovis*. *International Journal of Mycobacteriology*, 5(5), 249. <https://doi.org/10.4103/2212-5531.192278>
38. National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *NCBI Resources*. U.S. National Library of Medicine. Retrieved June 2, 2025, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
39. Neto, P. S. B., Medeiros, G. B., Morais, D. A., Limeira, C. H., Higino, S. S., Araújo, F. R., Azevedo, S. S., & Alves, C. J. (2024b). Prevalence of bovine tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 44. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-7390>
40. Noël Harijaona Ratovonirina. Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches *Mycobacterium tuberculosis* circulant à Antananarivo, Madagascar. *Médecine humaine et pathologie*. Université Paris-Saclay; Université d'Antananarivo; Institut Pasteur (Tananarive), 2017. <https://theses.hal.science/tel-01784738v1>
41. Organisation mondiale de la santé animale. (2019). Tuberculose des mammifères. <https://www.woah.org/fr/maladie/tuberculose-des-mammiferes/>

42. Rastogi, N., Legrand, E., & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 21–54. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1265>
43. Sahraoui, N., Müller, B., Guetarni, D., Boulahbal, F., Yala, D., Ouzrout, R., Berg, S., Smith, N. H., & Zinsstag, J. (2009). Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Veterinary Research*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-4>
44. Sechi, L. A., Zanetti, S., Sanguinetti, M., Molicotti, P., Romano, L., Leori, G., Delogu, G., Boccia, S., La Sorda, M., & Fadda, G. (2001). Molecular Basis of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1645–1648. <https://doi.org/10.1128/aac.45.6.1645-1648.2001>
45. Sharma, T., Alam, A., Ehtram, A., Rani, A., Grover, S., Ehtesham, N. Z., & Hasnain, S. E. (2022). The *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS Protein Family Acts as an Immunological Decoy to Subvert Host Immune Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 525. <https://doi.org/10.3390/ijms23010525>
46. Smith, N. H., Gordon, S. V., De La Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R. S., & Hewinson, R. G. (2006). Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9), 670–681. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1472>
47. Soliman, NS, Soliman, MS, Khairat, SM et al. Diversité génétique et résistance aux médicaments chez les isolats de *Mycobacterium bovis* issus de tuberculose zoonotique par séquençage du génome entier. *BMC Genomics* 25 , 1024 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10909-8>
48. T.Garnier, K.Eiglmeier, J.Camus, N.Médine, H.Mansour, M.Pryor, S.Duthoy, S.Groncin, C.Lacroix, C.Monsempé, S.Simon, B.Harris, R.Atkin, J.Doggett, R.Mayes, L.Keating, P.R.Wheeler, J.Parkhill, B.G.Baril, S.T. Cole, S.V. Gordon, &R.G.Hewinson, La séquence complète du génome de *Mycobacterium bovis* , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (13) 7877-7882, <https://doi.org/10.1073/pnas>

49. Tazerart, F. (2021). *Contribution à l'étude de la tuberculose bovine dans quelques régions d'Algérie: Approche lésionnelle et moléculaire*. <http://dspace.univ-tiaret.dz/handle/123456789/3615>
50. Tazerart, F., Saad, J., Sahraoui, N., Yala, D., Niar, A., & Drancourt, M. (2021). Whole Genome Sequence Analysis of Mycobacterium bovis Cattle Isolates, Algeria. *Pathogens*, 10(7), 802. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070802>
51. Tialla, D., Ouédraogo, A., & Tarnagda, Z. (2021). Tuberculose bovine et conséquences associées dans la commune rurale de Tanghin-Dassouri au Burkina Faso. *Science et Technique, Sciences de la Santé*, 44(1), 25–32. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5793966>
52. Tian, C., & Jian-Ping, X. (2010a). Roles of PE_PGRS family in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and novel measures against tuberculosis. *Microbial Pathogenesis*, 49(6), 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.07.004>
53. Tschopp, Rea. « Chapitre 15 - Tuberculose bovine à l'interface homme-bétail-faune sauvage en Afrique subsaharienne ». *One health, une seule santé*, édité par Jakob Zinsstag et al., Éditions Quæ, 2020, <https://books.openedition.org/quæ/36150>.
54. Vargas, A. P., Rios, A. A., Grandjean, L., Kirwan, D. E., Gilman, R. H., Sheen, P., & Zimic, M. J. (2020). Determination of potentially novel compensatory mutations in rpoC associated with rifampin resistance and rpoB mutations in Mycobacterium tuberculosis Clinical isolates from peru. *International journal of mycobacteriology*, 9(2), 121–137. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_27_20
55. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(3), 495–548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
56. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M. and Barton, G. J. (2009) "Jalview Version 2 -a multiple sequence alignment editor and analysis workbench"*Bioinformatics* 25 (9) 1189-1191doi: 10.1093/bioinformatics/btp03
57. Yamada, H., Yamaguchi, M., Chikamatsu, K., Aono, A., & Mitarai, S. (2015). Structome analysis of virulent Mycobacterium tuberculosis, which survives with only 700 ribosomes per 0.1 fl of cytoplasm. *PloS one*, 10(1), e0117109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117109>

58. Zaw, M. T., Emran, N. A., & Lin, Z. (2018). Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(5), 605–610. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.005>

Annexe

ANNEXE :

Tableau I: Séquences du gène PGRS26 des souches *M.bovis* récupérer pour construire une arbre phylogénétique

Espèce	Origine	Numéro d'accèsion/projet WGS(Date)	Hôte
<i>M.bovis</i>	Royaume-Uni	LT708304.1(1998)	BOVIN
	Irlande	CP133602.1(2021)	
		CP133601.1(2021)	
		CP133603.1(2021)	
		Argentine	
	JQEN01000000(2009)		
	Algérie(2017)	CSURQ1128(2017)	
		CSURQ1131(2017)	
		CSURQ1132(2017)	
		CSURQ1134(2017)	
		CSURQ1140(2017)	
	France	CP096839.1(2008)	
		CP096844.1(2005)	
		CP096843.1(2001)	
		CP096845.1(1999)	
		CP096842.1(2011)	
		LR699570.1(2014)	
	Uruguay	NAZM01000000(2015)	
		NAZP01000000(2015)	
	Chine	CP010332.1(2016)	
	Brésil	CP015773.2 (2010)	
		JAIOHG010000000(2018)	
		JAIOHE010000000(2018)	
JAIOHH010000000(2018)			
Inde	CP023708.2(1986)		
Canada	CP160832.1(2023)		
	CP027035.1(2002)		
	CP117298.1 (2022)		
Chine	CP010332.1(2016)		
Belgique	CP039850.1(2016)		
Russie	CP011455.1(2006)		
<i>M.riyadhense</i>	Arabie Saoudite	CP045092.1(2018)	Homo sapiens
<i>M.liflandii</i>	États-Unis	CP003899.1(2001)	Xenopus tropicalis(grenouille)
<i>M.marinum</i>	États-Unis	CP025779.1(2008)	poisson
<i>M.pseudoshottsii</i>	Grèce	CP155055.1(2019)	Argyrosomus regius(poisson)
<i>M.ulcerans</i>	Japan	AP017635.1(2005)	Homo sapiens
<i>M.marinum</i>	Chine	CP092981.1(2020)	Oncorhynchus kisutch(poisson)

Tableau II : Séquences du gène PGRS26 présentes dans différentes souches du complexe MTBC utilisées pour la construction d'un arbre phylogénétique

L'espece	L'origine	Numéro d'accesion/projet WGS(Date)	L'hote
M.tuberculosis	États-Unis	AL123456.3(1934)	Homo sapiens
	Afrique du sud	CP041821.1(2008)	Homo sapiens
	Russie	CP071128.1(2018)	Homo sapiens
	Pérou	CP089774.1(2012)	Homo sapiens
	Inde	CP005386.1(2013)	Homo sapiens
	Hong Kong	CP022578.1(2012)	Homo sapiens
M.orygis	Canada	CP063804.2(1997)	Homo sapiens
	Inde	CP138660.1(2022)	Bovine
M.caprae	Chine	CP189862.1(2023)	Cerf sika
	Espagne	MWXD01000000(1996)	Chèvre
M.bovis BCG	France	AM408590.1	Souche de laboratoire
	Usa	CP003494.1	Souche de laboratoire
	Brésil	AM412059.2	Souche de laboratoire
	Japon	AP010918.1	Souche de laboratoire
M.mungi	Botswana	LXTB01000000(2013)	Mungos
M.pinnipedi	Australie	MWXB01000000(1986)	/
M.bovis	Royaum-uni	LT708304.1(1998)	Bovine
	Algérie	CSURQ1128(2017)	Bovine
		CSURQ1131(2017)	
		CSURQ1132(2017)	
		CSURQ1134(2017)	
CSURQ1140(2017)			
M.canetti	Djibouti	FO203508.1(1997)	Homo sapiens
		FO203510.1(1999)	
		HE855708.1(2003)	
		FO203509.1(2004)	
M.africanum	Somalie	HE572590.1(1969)	Homo sapiens
	Colombie	CP014617.1(2006)	Homo sapiens
	Chine	CP010334.1(2016)	Homo sapiens
	Gambie	FR878060.1(2004)	Homo sapiens

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb – Blida 1 –



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'Etudes

En Vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Génétique

THEME

Etude in silico de la variabilité génétique du gène de la résistance à la rifampicine *rpoB* chez *Mycobacterium bovis* isolé en Algérie et étude phylogénétique basée sur le gène PGRS26

Présenté par : Abismail Yacine et Bahloul Achouak

Devant le jury composé de :

- | | | |
|-----------------|-----------|--------------|
| • Dr Zerouti | MCA/USDB1 | Présidente |
| • Dr Benhoua | MCB/USDB1 | Examinatrice |
| • Dr Ammali N. | USDB1 | Promotrice |
| • Pr Guetarni D | Pr/USDB1 | Co-promoteur |

Année universitaire 2024-2025

Benhoua F