



**HAL**  
open science

## Acquisition de nouvelles connaissances génétiques sur les souches de *Mycobacterium bovis*, circulant en France, par l'approche du séquençage du génome complet.

Ciriac Charles

### ► To cite this version:

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 vétérinaire et santé animale. 2022. Français. NNT: . tel-03968029

**HAL Id: tel-03968029**

**<https://anses.hal.science/tel-03968029>**

Submitted on 1 Feb 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université Paris-Est Sup**

**Spécialité : Microbiologie**

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

*par*

**Ciriac CHARLES**

**Acquisition de nouvelles connaissances génétiques sur les souches de *Mycobacterium bovis*, circulant en France, par l'approche du séquençage du génome complet.**

Directrice de thèse : **Maria-Laura BOSCHIROLI**

Co-directeur de thèse : **Franck BIET**

Co-encadrante de thèse : **Lorraine MICHELET**

**Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 25/10/2022**

**Composition du jury :**

Nadia HADDAD, Professeure, ENVA

Guislaine REFRÉGIER, Maîtresse de conférences (HDR), Université Paris Saclay

Anne-Laure BANULS, Directrice de recherche, IRD

Nadia HADDAD, Professeure, ENVA

Sylvain GODREUIL, Professeur, CHU de Montpellier

Maria-Laura BOSCHIROLI, Directrice de recherche, ANSES

Franck BIET, Directeur de recherche, INRAE (Centre Val de Loire)

Lorraine MICHELET, Chercheur, ANSES

Président/e

Rapporteur & Examinatrice

Rapporteur & Examinatrice

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse

Co-Directeur de thèse

Invitée

**Title : Acquisition of new genetic knowledge on *Mycobacterium bovis* strains circulating in France through whole genome sequencing.**

**Keywords : Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, Whole genome sequencing, IS6110, Molecular biology, Bioinformatics analysis and Microbiology.**

**Abstract :**

*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) is the etiological agent of bovine tuberculosis (bTB), a zoonotic disease with a high socioeconomic impact. After having reduced the prevalence of this disease below 0.1% for 6 years, France was recognised bTB free in 2001 which is a very advantageous situation for trading. However, this status is threatened in the recent years by the re-emergence of bTB in some French regions. bTB outbreaks are present in very localized areas and are due to persistent *M. bovis* strains with specific genotypes (defined by spoligotyping and MLVA typing). It is therefore important to understand if among the reasons for bTB increase, genetic factors linked to these dominant genotypes could be included. Furthermore, the transmission link between infected animals (which can involve those of different cattle herds and different wildlife species) remains difficult to establish in regions sharing the same *M. bovis* genotype. Analysis of whole-genome single nucleotide polymorphisms compared with appropriate reference genomes can accurately differentiate field strains. However, new whole genomes closer to the French field strains are needed to perform these studies.

Ten new complete genomes were sequenced using MinION and Illumina technologies. Despite the high stability of *M. bovis* genome, their characterization and comparison allowed a better description of genetic lineages by defining specific genetic criteria for some of them. The use of complete genomes allows a better genomes annotation which improves our knowledge of the genetic diversity of the *M. bovis* genomes. The copy number of an insertion sequence, IS6110, was found to be variable between the different complete genomes. This sequence plays an important role in genome plasticity of the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis* and was found in high copy numbers in representative genomes of highly prevalent genotypes whereas *M. bovis* is considered to have one or very few copies.

We therefore studied the abundance and location of IS6110 in a larger panel of *M. bovis* genomes representative of the French diversity. These results confirmed that the most persistent genotypes were those with multiple copies of IS6110 and that two of the most common genotypes found in France in recent years present a very high copy number (more than 10). Further studies on 3 important genotypes, SB0120-DHV, SB0120-CO and a sub-group of Cluster A/F4 family, which are respectively found in Dordogne and Haute-Vienne, Côte d'Or and Atlantic Pyrenees (French regions), showed a quite high stability of IS6110 number and their insertion site between host species over 6-to-17-year periods. IS6110-related genetic changes did not appear to occur for host adaptation as suggested for highly prevalent *Mycobacterium tuberculosis* strains.

This work has improved our knowledge on the *M. bovis* lineages circulating in France and worldwide by establishing a list of genetic characteristics specific to them. Some of these, such as IS6110, seem to be correlated with the epidemiological success of certain genotypes. The new genomes will help to better understand the bTB transmission dynamics in multihost

systems and to implement more effective control measures to eradicate the disease in these areas.

**Titre : Acquisition de nouvelles connaissances génétiques sur les souches de *Mycobacterium bovis*, circulant en France, par l’approche du séquençage du génome complet.**

**Mots-clés : Tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, Séquençage de génomes complets, IS6110, biologie moléculaire, Analyse bioinformatique et Microbiologie.**

**Résumé :**

*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) est l’agent étiologique de la tuberculose bovine (bTB) qui est une maladie zoonotique ayant un fort impact socioéconomique. Après avoir réduit la prévalence de cette maladie en dessous de 0,1% pendant 6 ans, la France a été reconnue indemne de bTB en 2001, ce qui est une situation très avantageuse pour le commerce. Ce statut est néanmoins menacé ces dernières années par la réémergence de la bTB dans certaines régions françaises. Ces foyers de bTB présents dans ces régions très localisées sont dus à des génotypes (défini par le profil spoligotype et le typage MLVA) spécifiques et persistants de ces régions. Il est donc important de comprendre si des facteurs génétiques liés à ces génotypes dominants peuvent expliquer leur succès épidémiologique. De plus, le lien de transmission entre les animaux infectés (pouvant impliquer des bovins domestiques et la faune sauvage) reste difficile à établir dans les régions partageant le même génotype de *M. bovis*. L’analyse des polymorphismes mononucléotidiques du génome entier comparé à des génomes de référence appropriés peut différencier précisément les souches de terrain. Cependant, de nouveaux génomes complets génétiquement plus proches des souches françaises de terrain sont nécessaires pour améliorer ces études.

Dix nouveaux génomes complets ont été séquencés avec les technologies MinION et Illumina. Malgré la grande stabilité du génome de *M. bovis*, la caractérisation et la comparaison des 10 génomes ont permis de mieux décrire les lignées génétiques identifiées en France en définissant des critères génétiques spécifiques pour certaines d’entre elles. L’utilisation de génomes complets permet une meilleure annotation des génomes ce qui améliore nos connaissances sur la diversité génétique des génomes de *M. bovis*. Le nombre de copies d’une séquence d’insertion, IS6110, s’est avéré variable entre les différents génomes complets. Cette séquence joue un rôle important dans la plasticité du génome de *Mycobacterium tuberculosis* et a été retrouvée en grand nombre dans des génomes représentatifs de génotype très prévalent alors que *M. bovis* est considéré comme ayant une ou très peu de copies.

Nous avons donc étudié l’abondance et la localisation d’IS6110 dans panel plus large de génomes de *M. bovis* représentatifs de la diversité française. Ces résultats ont confirmé que les génotypes les plus persistants étaient ceux présentant plusieurs copies d’IS6110 et que deux des génotypes les plus retrouvés en France ces dernières années avaient plus de 10 copies. Des études supplémentaires sur 3 génotypes majoritaires, SB0120-DHV, SB0120-CO et un sous-groupe du cluster A/ famille F4, qui sont respectivement très présents dans les



régions françaises de Dordogne et Haute-Vienne, Côte d'Or et Pyrénées-Atlantiques, ont montré une grande stabilité du nombre d'IS6110 et de leur site d'insertion entre les espèces hôtes sur des périodes de 6 à 17 ans. Les changements liés aux IS6110 ne semblent pas se produire lors de changement d'hôte, comme cela était suggéré pour la lignée Beijing de *M. tuberculosis*. Ce travail a permis d'améliorer nos connaissances des génotypes de *M. bovis* circulant en France et dans le monde en établissant des listes de caractéristiques génétiques. Certains évènements génétiques, comme l'insertion d'IS6110, semblent être corrélés au succès de certains génotypes. Les nouveaux génomes permettront de mieux comprendre la dynamique de la transmission de la bTB dans les systèmes multi-hôtes et de mettre en place des mesures de contrôle plus efficaces pour éradiquer la maladie dans ces zones.

« On ne devient pas chef parce qu'on le mérite, andouille ! On devient chef par un concours de circonstances, on le mérite après ! Moi, il m'a p'têt' fallu dix ans pour mériter mon grade, si pas vingt. Tous les jours, j'ai travaillé pour pas nager dans mon uniforme. Y a pas trente-six solutions. Arturus ? Hein ? Fais semblant ! Fais semblant d'être Dux. Fais semblant de mériter ton grade. Fais semblant d'être un grand chef de guerre. Si tu fais bien semblant, un jour tu verras, t'auras plus besoin ! »

Pierre Mondy, Kaamelott, Livre VI

## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier **Maria-Laura Boschioli** et **Franck Biet** d'avoir co-dirigé ces travaux de thèse ainsi que **Lorraine Michelet** de m'avoir également encadré. Merci pour toutes vos discussions, votre temps et votre patience dont vous avez fait preuve lors de ces 3 années. Je ne vous remercierais jamais assez de m'avoir fait confiance pour porter ce sujet de thèse. Grâce à vous j'ai beaucoup évolué, professionnellement et personnellement.

J'aimerais ensuite remercier les membres de mon comité de suivi de thèse pour leur bienveillance et leurs idées. Merci à **Grégory Caignard** d'avoir veillé au bon déroulement de ma thèse et pour tes discussions aux détours des couloirs. Je remercie tout particulièrement **Laurent Moulin** qui m'a suivi depuis mon alternance et dont je suis très content de partager avec lui repas et discussion. Merci également à **Sabine Delannoy** pour tes idées concernant l'optimisation de l'extraction d'ADN et l'accès au Nanodrop. J'ai bien évidemment une pensée particulièrement pour **Wladimir Sougakoff** qui nous a quittés au début de l'année 2021. Tes précieux conseils lors des différentes réunions m'ont permis de prendre du recul sur mes résultats et garder un cap intéressant dans l'évolution de mes recherches.

Merci beaucoup à mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je voudrais remercier **Nadia Haddad** d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury. J'ai aimé ta gentillesse et ton expertise de pointe sur la tuberculose bovine qui a permis d'améliorer quelques passages de ce manuscrit. Merci à **Guislaine Refrégier** et **Anne-Laure Banuls** pour vos rapports très détaillés sur mon manuscrit et de m'avoir permis de soutenir. J'ai vraiment apprécié les échanges que nous avons pu avoir que j'ai trouvé très constructifs. Enfin, merci à **Sylvain Godreuil** d'avoir également fait partie de ce jury, pour tes questions et ton enthousiasme.

Lorsque j'ai démarré ma thèse et que je suis arrivé dans l'unité UZB (Unité Zoonoses Bactériennes), j'ai fait le pari de la commencer dans un environnement nouveau et j'étais à la fois soucieux et impatient de découvrir si celui-ci serait accueillant. Après 3 ans, je peux dire que c'était un très bon choix, car dès le premier jour j'ai pu y être accueilli à bras ouvert et avec toute la bienveillance que je ne pouvais espérer trouver. Je voudrais remercier tout d'abord **Claire Ponsart** et **Karine Laroucau** de m'avoir accueilli à l'UZB. J'ai aimé le fait que vous ayez toujours pris le temps de m'écouter, savoir où j'en étais dans ma thèse, si j'allais bien et de discuter de tout et de rien.

Mention spéciale à **Claire** et **Lorraine** pour avoir supporté nos longues discussions hebdomadaires sur la NBA avec **Guillaume Girault**. J'espère que vous aurez pu au moins apprendre certaines choses sur ce magnifique sport.

Je souhaitais ensuite encore remercier **Maria-Laura** de m'avoir accueilli dans l'équipe Mycobactérie qui l'a fait avec beaucoup de bienveillance dès les premiers jours. Je me souviendrais toujours de ces longues réunions d'équipe du lundi matin et des sessions au P3 pour savoir si la souche X avait enfin poussé. Je me souviens des nombreuses manip d'optimisations pour l'extraction d'ADN que j'ai fait, de l'incertitude que nous avons eue lors de l'annonce du confinement et de la fermeture de notre P3 lorsque je voulais y faire mes ultimes manip. Je me souviens aussi des journées qui commencent tôt et de celles qui finissent tard, des journées où il faut rendre 2 posters et corriger une Xème version d'un article. Dans tous ces moments de doute, de questionnement et de difficultés, j'ai pu trouver du

soutien de mon équipe. Merci **Maria-Laura, Lorraine, Krystel De Cruz, Sylvie Hénault, Jennifer Tambosco** et **Florence Va** d'avoir toujours été là. Je me souviens particulièrement de **Sylvie** qui me trouvait fatigué quelques fois et me rappelait qu'il était important de savoir couper, ou de **Krystel** qui était toujours attentive à ce que j'aie bien et que je garde le moral (avec du chocolat souvent). Merci à vous pour votre sollicitude. Mais de cette thèse je retiendrais aussi les moments de joie et de réussite, l'étincelle dans les yeux de **Lorraine** lorsque j'ai annoncé avoir enfin une qualité et quantité d'ADN suffisantes, celle que nous avons eue au moment de la publication de notre article ou lorsque je vous présentais mes derniers résultats.

Merci à **Fabien Vorimore** et **Guillaume** pour leur aide dans mes débuts en bio-informatique. Je voudrais remercier le groupe « de jeune » de l'UZB pour les débats, souvent passionnés que nous avons eu les midis, pour les discussions, de tout et de rien, les apéros du vendredi et pour le foot, basket et squash que nous avons faits (même si je suis déçu de ne pas avoir pu faire de journée sportive de l'ANSES lors de mes trois années). Ce soutien m'a permis de penser à autre chose que ma thèse et décompresser et je vous remercie pour cela. Je remercie tout particulièrement **Krystel, Guillaume, Ali Moulay Cherfa, Ludivine Perrot, Florence, Maëline Ribeiro, Vincent Sester, Luca Freddi** et **Vitomir Djokic** pour les nombreuses discussions que nous avons eues et qui m'ont fait évoluer autant professionnellement que personnellement. Merci également à **Christiane Mendy** pour ton attention toute particulière à mon égard que j'ai appréciée. Je compte bien que nous réussissions à voir un match du Poitiers Basket et compte sur toi pour me prévenir quand tu descendras dans le Poitou. J'ai également aimé organiser pendant 2 ans le Secret Santa de l'unité, faire et recevoir des cadeaux, mais aussi voir certains faire de véritable enquête pour retrouver les pères Santa. Je laisse la prochaine édition aux mains de **Mégane Gasque** et je suis sûr que cette session sera aussi bien que les précédentes. Enfin, je voulais également remercier **Rebiha Mesbah** et **Marie France Devaux** pour le soutien technique et logistique que vous m'avez apporté.

Je voulais également saluer les autres personnes de l'ANSES avec qui j'ai pu avoir des interactions. Je pense tout de suite à **Pascal Boireau** dont les discussions que nous avons eues ont toujours été très intéressantes. Je me souviens particulièrement d'une sur le changement climatique. Tu soulignais et avec beaucoup d'exactitude, le double rôle du scientifique dans la société qui avait « le devoir » d'informer et d'agir face à l'urgence de la situation.

Je pense également à **Nathalie Bongoua, Laeticia Charron, Stanislas Adjai** et **Cyrille Vanderriele** pour leur soutien et leur aide dans les différents événements et/ou problèmes que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse.

J'ai également une pensée particulière aux doctorants que j'ai pu rencontrer sur le site vétérinaire de Maisons-Alfort. Je pense en particulier à **Mégane, Madeleine De Sousa Violante, Amalia Rataud, Hélène Duault, Clémence Nadal, Amaias Avalos, Maureen Duflot, Camille Migné, Maellys Kévin, Erika Ornlas Eusebio, Noah Brosseau, Filip Dàmek** et **Pierre Bouteiller**. Nous avons traversé une partie ou la totalité de notre thèse ensemble et nous nous sommes soutenus dans cette épreuve qu'est la thèse.

J'aimerais ensuite remercier **Thierry Cochard** pour son aide pour l'extraction d'ADN ainsi que **Cyril Condé** et **Maxime Branger** pour leur assistance et leur patience dans l'apprentissage de la bio-informatique. Merci à **Franck** de m'avoir accueilli le temps d'une semaine dans son équipe pour

prendre un bol d'air frais loin de Paris. Merci beaucoup pour tout le temps que vous m'avez consacré et pour la première session d'escalade sur bloc.

Avec l'ANSES, ce projet était co-financé par le European Joint Programme (EJP) que je remercie également. Je ne peux m'empêcher de penser au fait que la crise Covid m'a empêché de participer en présentiel aux congrès annuels du projet à Prague, Copenhague et Orvieto. Néanmoins je suis content que ceux-ci aient eu lieu quand même en distanciel ce qui m'a permis d'y participer, présenter mes résultats et travailler mon anglais. Je voudrais remercier **Piyali Basu** qui a vraiment été une personne ressource pour comprendre les nombreux documents fournis par EJP. Merci pour ton temps, ta disponibilité et ta joie de vivre. Merci également à **Aurore Poirier, Bryony Armson, Roberto La Ragione, Pikka Jokelainen** et **Hein Imberechts** pour votre disponibilité et votre aide lors des congrès.

Je souhaitais également saluer les autres étudiants issus de ce même projet européen. Nous n'avons pas pu nous rencontrer tous en vrai, mais j'ai aimé pouvoir échanger, parfois longuement, avec certains d'entre vous.

Merci également au personnel de l'école doctorale ABIES pour ces trois années. Je voulais citer **Alexandre Perry** pour sa très grande gentillesse et disponibilité. Merci également à **Christine Duvaux-Ponter** de m'avoir suivi pendant ces trois années et répondu à toutes mes nombreuses interrogations. Je voulais également remercier **Pierre Larraufie** pour son aide concernant plusieurs démarches administratives au sein de l'école doctorale. De plus, je voulais également remercier certains autres étudiants que j'ai croisé en particulier mon acolyte **Madeleine**. Merci de m'avoir soutenu, surtout dans les derniers efforts qu'était la rédaction de manuscrit et pour nos discussions sur les génomes bactériens.

Je voudrais ensuite remercier beaucoup mes anciens encadrants : **Sophie Haen, Vincent Delafont, Nina Entelis** et **Yann Gallais**. Je vous remercie pour votre gentillesse, le temps que vous m'avez consacré ainsi que votre savoir. Je suis heureux d'avoir pu garder avec vous de bons contacts et j'espère que cela pourra continuer. L'aboutissement de ce travail de thèse est aussi dû à ce que vous m'avez appris et j'espère donc, que vous aussi vous pourrez être fier de ce que j'ai pu devenir !

Merci au réseau des jeunes microbiologistes fundamentalistes et à ces membres de m'avoir permis de vous rejoindre. Cette ouverture d'esprit et de domaine a été très instructive pour moi. Merci pour les discussions et les verres que nous avons pu échanger. Je me dois aussi de remercier les rushers du discord PHD STUDENT avec qui j'ai pu terminer sereinement ma thèse en échangeant sur nos doutes, nos objectifs et nos victoires. Je ne pourrais que conseiller à chaque doctorant de faire partie de ce réseau tellement enrichissant.

Plusieurs personnes, rencontrés lors de différents évènements m'ont aussi beaucoup marqué lors de cette thèse par leur expertise, leur gentillesse et leur amitié. J'aurais donc voulu également remercier pour ces 3 années **Ana Guimaraes, Thomas Brauge, Adrian Allen, Tom Jové, Sandrine Lesellier, Christian Gortazar, Serge Morand** et **Benoit Doublet**.

Vous l'aurez compris, une thèse est également une aventure humaine. En dehors de mon travail, j'ai pu rencontrer de nombreuses personnes qui m'ont aidé à profiter pleinement de la magnifique ville que peut être Paris. Ces personnes m'ont été importantes durant ces trois ans et j'espère que notre amitié continuera à travers les régions. Je dois en placer une pour **Daimy BÉLÉ**, toujours disponible

pour une bière qui a grandement aidé à mon insertion parisienne. L'histoire n'aurait sûrement pas été la même sans lui. Merci également à mes amis, que des Parisiens mal avertis appelleraient provinciaux. Vous m'avez été également d'un grand soutien durant cette période et je prenais un réel plaisir de rentrer vous voir, malgré la distance. J'ai d'ailleurs été extrêmement touché des personnes qui ont fait le déplacement pour m'écouter parler (encore) pendant des heures de *Mycobacterium bovis*. J'ai été heureux de pouvoir compter sur vous lors de ce moment important pour moi et sachez-le, même si vous le savez déjà, vous pourrez compter sur moi.

Enfin je dois remercier ma famille qui a toujours été là pour moi. Je pense notamment à mon frère **Arthur Charles** qui m'a aidé au tout début pour coder en python, à mes parents et à **Loren Masson**. Vous aussi, vous avez fait le déplacement pour moi, cela compte et je vous en suis extrêmement reconnaissant. Merci de m'avoir soutenu dans les bons et les mauvais moments, et d'avoir toujours été là pour moi. Dans les dernières semaines fatidiques du rendu du manuscrit, vous étiez mon phare qui m'aidait à garder la tête hors de l'eau lorsque la mer était agitée.

Dans ton manuscrit de thèse **Loren**, tu m'as dit que c'était à mon tour d'écrire ce manuscrit et de soutenir cette thèse. Cela n'a pas été toujours facile, j'ai supprimé, j'ai modifié, j'ai repris de nombreuses choses, mais jamais je n'ai abandonné et aujourd'hui je suis fier de pouvoir dire que nous sommes docteurs. À présent, regardons devant nous, car le meilleur est à venir !

Je m'excuse d'avance de ne pas avoir pu citer tout le monde et mentionner toutes les anecdotes qui s'étaient déroulées pendant ces trois ans. Il fallait faire un choix, mais je sais que ceux qui m'ont aidé durant cette aventure savent à quel point je leur suis reconnaissant. Je pense que j'ai toujours pris le temps de remercier les personnes qui avaient pris de leur temps pour m'aider, j'aimerais dire encore une fois à ces personnes merci beaucoup !

## Abréviations

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ANSES</b>	Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>BAAR</b>	Bacilles Acido-Alcool-Résistants
<b>BCG</b>	Vaccin Bilié de Calmette et Guérin
<b>BK</b>	Bacille de Koch
<b>bTB</b>	Tuberculose bovine, <i>bovine tuberculosis</i> en anglais
<b>CC</b>	Complexe Clonal
<b>CDS</b>	Séquence codante, <i>CoDing Sequence</i> en anglais
<b>Cluster</b>	Groupe génétique
<b>CRISPR</b>	Répétitions palindromiques courtes, <i>Clustered Regularly Intersperced Short Palindromic Repeats</i> en anglais
<b>COG</b>	Groupe de gène orthologues, <i>Clusters of Orthologous Groups</i> en anglais
<b>DGAI</b>	Ministère en charge de l'agriculture et de l'alimentation
<b>FAO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, <i>Food and Agriculture Organization</i> en anglais
<b>GDS</b>	Groupement de Défense Sanitaire
<b>HSR</b>	Hyper Sensibilité Retardée
<b>IDT</b>	Test d'IntraDermoTuberculation comprenant l'IDT simple (IDS) et l'IDT comparée (IDC)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>INRAe</b>	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
<b>IS</b>	Séquence d'insertion, <i>Insertion Sequence</i> en anglais
<b>LDA</b>	Laboratoire Départemental d'Analyse
<b>LNR</b>	Laboratoire National de Référence
<b>MLVA</b>	Analyse multilocus du nombre variable de répétitions en tandem, <i>Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i> en anglais
<b>MNT</b>	Mycobactéries non tuberculeuses
<b>MTBC</b>	Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. tuberculosis complex</i> en anglais
<b>NCBI</b>	Centre national d'information sur les biotechnologies, <i>National Center for Biotechnology Information</i> en anglais
<b>OHEJP</b>	Programme européen commun une seule santé, <i>One Health European Joint Programme</i> en anglais
<b>OIE</b>	Organisation mondiale de la santé animale
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OTF</b>	Indemne de tuberculose bovine, <i>Officially bovine Tuberculosis Free</i> en anglais
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase, <i>Polymérase Chain Reaction</i> en anglais,
<b>Plateforme ESA</b>	Plateforme Epidémiologie Santé Animale
<b>PPD</b>	Dérivée protéinique purifiée, <i>Purified Protein Derivative</i> en anglais
<b>RD</b>	Région de Différence
<b>RFLP</b>	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> en anglais
<b>R0</b>	Taux de reproduction de base
<b>SNP</b>	Polymorphismes mononucléotidiques, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> en anglais
<b>Spacer</b>	Espaceur
<b>SRA</b>	Lecture de séquences archivées ADN, <i>Sequence Read Archive</i> en anglais
<b>subsp</b>	Sous espèce, <i>subspecies</i> en anglais
<b>TB</b>	TuBerculose
<b>WGS</b>	Le séquençage des génomes entier, <i>Whole Genome Sequencing</i> en anglais



# Table des matières

REMERCIEMENT.....	6
ABREVIATIONS .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	13
LISTE DES FIGURES .....	14
LISTE DES ANNEXES .....	17
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. L'AGENT DE LA TUBERCULOSE BOVINE, MYCOBACTERIUM BOVIS.....</b>	<b>20</b>
1.1.1. Les mycobactéries .....	20
1.1.2. Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) et les agents de lèpre .....	22
1.1.3. Le complexe de Mycobacterium tuberculosis.....	23
1.1.4. L'agent principal de la tuberculose bovine, Mycobacterium bovis .....	34
1.1.5. L'infection par M. bovis, la tuberculose animale et ses facteurs de risque .....	39
<b>1.2. LES METHODES DE DETECTION DE LA TUBERCULOSE.....</b>	<b>42</b>
1.2.1. Diagnostic ante mortem .....	43
1.2.2. Diagnostic post mortem .....	47
1.2.3. Génotypage des souches de M. bovis .....	49
<b>1.3. L'EPIDEMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE BOVINE .....</b>	<b>53</b>
1.3.1. La tuberculose bovine dans le monde.....	53
1.3.2. La tuberculose bovine en Europe .....	54
1.3.3. La situation française .....	56
1.3.4. Les génotypes des souches de Mycobacterium bovis françaises .....	63
<b>1.4. LE SEQUENÇAGE DE M. BOVIS ET SON APPLICATION.....</b>	<b>65</b>
1.4.1. Les différents types de séquençage .....	65
1.4.2. Le séquençage du MTBC.....	71
<b>2. OBJECTIFS .....</b>	<b>78</b>
<b>3. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>81</b>
<b>3.1. PANEL DE SOUCHES UTILISEES .....</b>	<b>82</b>
3.1.1. Génomes représentant la diversité génétique de M. bovis en France .....	82
3.1.2. Génomes de souches sympatriques .....	82
3.1.3. Les génomes complets .....	83
<b>3.2. OBTENTION DES GENOMES COMPLETS.....</b>	<b>84</b>
3.2.1. Obtention de l'ADN mycobactérien.....	84
3.2.2. Séquençage des génomes .....	87
3.2.3. Assemblage des génomes .....	88
<b>3.3. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES .....</b>	<b>90</b>
3.3.1. L'analyse pan-génomique.....	90
3.3.2. Identification des SNP .....	90
3.3.3. Analyses phylogénétiques .....	91
3.3.4. La recherche de différences génomiques structurelles .....	92
<b>3.4. RECHERCHE DE LA SEQUENCE D'INSERTION IS6110.....</b>	<b>93</b>
3.4.1. ISMapper.....	93
3.4.2. Confirmation de résultats in silico par l'amplification et le séquençage de séquence d'intérêt .....	94
<b>4. SEQUENÇAGE DE NOUVEAUX GENOMES COMPLETS .....</b>	<b>96</b>

4.1. TRAVAUX PUBLIES DANS MICROORGANISMS.....	98
<b>5. LES IS6110 DANS LES SOUCHES FRANÇAISES DE M. BOVIS .....</b>	<b>114</b>
5.1. TRAVAUX PUBLIES DANS FRONTIERS IN MICROBIOLOGY : .....	117
5.2. ÉTUDE COMPLEMENTAIRE DANS 2 PANELS DE SOUCHES SYMPATRIQUES .....	127
5.2.1. Géotypes SB0821/F007 et SB0832/F015 .....	127
5.2.2. Géotype SB0120-DHV .....	129
5.3. VARIABILITE DE LA SEQUENCE IS6110.....	131
5.3.1. IS6110 dans la région DR.....	131
5.3.2. Particularité du cluster G .....	132
5.3.3. Séquence d'IS6110 mutée.....	132
5.4. DISCUSSION.....	134
<b>6. DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>137</b>
<b>7. PERSPECTIVES .....</b>	<b>142</b>
<b>8. REFERENCES.....</b>	<b>145</b>
<b>9. ANNEXES .....</b>	<b>176</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Résultat PCR obtenus pour différents membres du MTBC avec différentes cibles génétiques. Le + indique la présence d'amplification de l'ADN d'une espèce pour une cible donnée. Le – indique l'absence d'amplification (Barbier et al., 2016; Halse et al., 2011; Hénault et al., 2006; Michelet et al., 2018c).....	49
<b>Tableau 2</b> : Comparaison des trois générations de séquençage en prenant en exemple un appareil de première génération et 2 appareils de chacune des deux autres générations (Amarasinghe et al., 2020; Fox et al., 2014; Liu et al., 2012; Mardis, 2008; Sahlin and Medvedev, 2021; Stoler and Nekrutenko, 2021).....	67
<b>Tableau 3</b> : Tableau présentant les génomes et données SRA (« <i>Sequence Read Archive</i> » en anglais, lectures de séquences archivées ADN) par technologies de séquençage, qui sont disponible sur NCBI (Centre national d'information sur les biotechnologies) en août 2022 pour <i>Mycobacterium tuberculosis</i> et <i>Mycobacterium bovis</i> . ....	70
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques de 5 génomes complets de MTBC dont les séquences sont disponibles sur le site NCBI (Centre national d'information sur les biotechnologies). ....	71
<b>Tableau 5</b> : Présentation des 10 génomes de <i>Mycobacterium bovis</i> séquencés complètement dans ce travail de thèse. ....	85
<b>Tableau 6</b> : Listes des amorces conçues et utilisées dans ce travail de thèse. A l'extrémité du nom, F indique une amorce sens et R une amorce dans le sens inverse. ....	95

## Liste des figures

- Figure 1** : Classification de *Mycobacterium bovis*. ..... 20
- Figure 2** : Coloration au Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium bovis*, observé avec une goutte d'huile au grossissement \*100. L'observation montre des bacilles roses correspondants à cet agent (obtenu au cours des travaux de thèse). ..... 21
- Figure 3** : Phylogénie de maximum de vraisemblance de souches du MTBC. L'astérisque marque l'expansion de la gamme d'hôtes au sein du MTBC. Les lignées L1 à L7 contiennent les agents de la tuberculose humaine tandis que les clades A1 à A4 contiennent les agents de la tuberculose animale. L'arbre a été enraciné avec *Mycobacterium canettii*. Cette figure provient de l'article de Brites et collaborateurs (Brites et al., 2018). ..... 25
- Figure 4** : Incidence de la tuberculose en 2020 dans le monde. Cette figure provient du rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) « Global Tuberculosis reports » de 2021..... 26
- Figure 5** : Représentation schématique des marqueurs moléculaires (SNP et RD) qui distinguent les espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Cette figure décrit plus particulièrement les membres responsables de la tuberculose animale. Les silhouettes d'animaux illustrent l'hôte principal auquel le membre de MTBC est associé. Les seringues indiquent la présence d'une souche vaccinale (Gagneux, 2017)..... 28
- Figure 6** : Représentation du génome de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur avec les régions de différence (RD) en comparaison avec *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Pour chacun des RD mis en évidence, il peut être observé l'impact sur la délétion totale ou partielle de gènes. Cette représentation provient du site internet [http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/b\\_rilova/copia%20de%20proyectobio/futuro/pagswebfuturo/perdidascbg.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/b_rilova/copia%20de%20proyectobio/futuro/pagswebfuturo/perdidascbg.htm). ..... 33
- Figure 7** : Représentation graphique de la réponse immunitaire chez le bovin après une infection par *Mycobacterium bovis* et au cours de l'augmentation de la charge bactérienne. La réponse immunitaire à médiation cellulaire (CMI) se développe au début de l'infection. En cas d'évolution clinique défavorable, elle est ensuite progressivement remplacée par une réponse immunitaire humorale et une production d'anticorps spécifiques à l'infection. Dans certains cas, le système immunitaire peut s'épuiser et donner lieu à une période d'anergie (Pollock and Neill, 2002)..... 44
- Figure 8** : Réalisation (photo de gauche) de l'injection de la tuberculine puis (photo de droite) de la mesure du pli de la peau (Philizot and Bénét, 2011). ..... 45
- Figure 9** : Profil d'une souche de spoligotype SB0120 déterminé sur le site <https://www.mbovis.org> sont également renseignés le pays où le spoligotype a été trouvé (pas présent ici), la date d'ajout et son code binaire (1=présence du spacer, 0= absence du spacer). ..... 52
- Figure 10** : Distribution de la tuberculose bovine de 2017 au premier semestre 2018 selon l'OIE (Source WAHIS <https://oiebulletin.fr/?panorama=3-01-tb-wahis-en>) ..... 54
- Figure 11** : Statut pour la bTB en 2020 de 27 pays membres de l'Union européenne (MS) et 9 non-membres (non-MS) selon le rapport de l'EFSA de 2021. Les pays ou région en bleu clair sont les pays indemnes de tuberculose alors que ceux indiqués en bleu foncé n'ont pas ce statut (Rapport Efsa 2021). ..... 56
- Figure 12** : Évolution de la tuberculose en France depuis 1955. Cette figure modifiée provient d'un article de Benet et collaborateurs (Benet et al., 2006). La ligne rouge représente la limite à ne pas dépasser pour conserver le statut d'indemne de bTB. .... 57
- Figure 13** : Différents niveaux de surveillance de la bTB dans les cheptels en France en 2020 (Forfait et al., 2022). ..... 59
- Figure 14** : Évolution de la prévalence de la tuberculose bovine en France de 1995 à 2020 (Delavenne et al., 2020; Forfait et al., 2022). La ligne rouge représente la limite à ne pas dépasser pour conserver le statut d'indemne de bTB. .... 59
- Figure 15** : Différents niveaux de surveillance de la tuberculose dans la faune sauvage mise en place par Sylvatub pour l'année 2020 (D'après Forfait et al., 2022). ..... 63

<b>Figure 16</b> : L'évolution génétique de <i>M. bovis</i> en France entre 1978 et 2013. Cette figure modifiée provient de l'article (Hauer et al., 2015). .....	64
<b>Figure 17</b> : Répartition géographique des différents génotypes de <i>Mycobacterium bovis</i> identifiés en élevage bovin en France métropolitaine en 2020 (d'après Forfait et al., 2022). .....	65
<b>Figure 18</b> : A : Répartition des groupes clonaux de <i>Mycobacterium bovis</i> majoritaire en Europe. Figure modifiée provenant de l'article de Rodriguez-Campos et collaborateur (Rodriguez-Campos et al., 2014). Les membres des groupes sont phylogénétiquement bien regroupés entre eux. B : Tableau représentant l'année de description et les principales caractéristiques des complexes clonaux de <i>M. bovis</i> définies au moment de la description des groupes (Berg et al., 2011; Branger et al., 2020; Müller et al., 2009; Rodriguez-Campos et al., 2012; Smith et al., 2011). .....	72
<b>Figure 19</b> : Arbre de maximum de parcimonie basé sur 9 170 SNP qui a été obtenu par l'alignement de 87 génomes de <i>Mycobacterium bovis</i> sur le génome de référence AF2122/97. La figure modifiée provient de l'article de Hauer et collaborateurs (Hauer et al., 2019) et a été créée avec MEGA4 (Tamura et al., 2007). L'arbre est subdivisé en 9 clusters décrits dans l'étude d'Hauer et collaborateur.....	74
<b>Figure 20</b> : Différence de discrimination entre une résolution avec les techniques de spoligotypage et de MLVA (A et C) et les SNP (9 170 SNP) (B et D). Cette comparaison prend en compte 87 génomes représentant la diversité française de <i>M. bovis</i> et utilise le génome de référence AF2122/97. Les arbres phylogénétiques UPGMA A et B ont été construit avec les différentes techniques de typage. Les arbres B et D sont des arbres à portées minimales, toujours construits selon les différentes techniques de typage. Cette figure modifiée provient de l'article d'Hauer et collaborateur (Hauer et al., 2019). .....	75
<b>Figure 21</b> : Représentation schématique du protocole de culture bactérienne jusqu'à l'extraction d'ADN et son séquençage par les technologies Illumina et MinION. ....	86
<b>Figure 22</b> : Représentation schématique de la stratégie d'assemblage <i>de novo</i> des génomes complets en partant des données de séquençage de technologies Illumina et MinION (en bleu) et en allant jusqu'aux génomes finaux (en vert) en mentionnant les différents outils utilisés et étapes d'évaluation de la qualité (en orange). Cette stratégie a été semi-automatisée (représenté par le « .py » en bas à droite de la figure). .....	88
<b>Figure 23</b> : Représentation schématique de la recherche de séquences d'insertion faite par ISMapper. Les séquences sont alignées sur la séquence d'intérêt afin de sélectionner les séquences s'alignant sur la séquence d'intérêt (b). Les séquences sélectionnées sont ensuite alignées sur un génome de référence afin de déterminer leur position sur le génome et donc la position de la séquence d'intérêt (c) (Hawkey et al., 2015). .....	94
<b>Figure 24</b> : Représentation des sites d'insertion d'IS6110 retrouvés dans 187 souches de spoligotype SB0821 (F007) et SB0832 (F015) (respectivement en marron et en vert) avec l'outil ISMapper et le génome de référence AF2122/97. Les sites d'insertion sont représentés par des carrés noirs et numérotés en fonction de la position sur le génome de référence (Annexe 4). Les 187 génomes sont présentés chronologiquement de 2002 à 2017 avec le génome de référence utilisé dans cette étude en première position. La dernière ligne permet de présenter l'hôte chez lequel a été isolé la souche : en vert le bovin ( <i>Bos taurus</i> ), en bleu le blaireau ( <i>Meles meles</i> ), en jaune le sanglier ( <i>Sus scrofa</i> ), en rose un porc et en gris un humain. ....	128
<b>Figure 25</b> : Représentation des sites d'insertion d'IS6110 retrouvé dans 227 souches SB0120-DHV avec l'outil ISMapper et le génome de référence Mb3601. Les sites d'insertion sont représentés par des carrés noirs en fonction du site d'insertion où ils ont été retrouvés. Les positions exactes des sites sont disponibles en Annexe 5. Les 227 génomes sont présentés chronologiquement de 2001 à 2017 avec le génome de référence utilisé dans cette étude en première position. La dernière ligne permet de présenter l'hôte où a été isolé la souche avec en vert le bovin ( <i>Bos taurus</i> ), en bleu le blaireau ( <i>Meles meles</i> ), en jaune le sanglier ( <i>Sus scrofa</i> ), en orange le renard ( <i>Vulpes vulpes</i> ), en rouge le cerf ( <i>Cervus elaphus</i> ) et en rouge foncé le chevreuil ( <i>Capreolus capreolus</i> ). .....	130
<b>Figure 26</b> : Arbre du maximum de parcimonie de 227 génomes SB0120-DHV sur la base de 320 SNP déterminés en comparaison avec le génome de référence Mb3601. L'analyse a été réalisée sur le logiciel	

Bionumerics (version 7.6, AppliedMath, Belgique). Les souches portant les sites d'insertion 9, 26 et 46 sont colorées respectivement en vert, rouge et violet. .... 131

**Figure 27** : Représentation du profil spoligotype et de la région CRISPR-Cas défini avec les outils bio-informatiques CRISPRbuilder-TB (<https://github.com/cguyeux/CRISPRbuilder-TB>) et TB-tools (<https://github.com/cguyeux/TB-tools>). L'analyse a été réalisée sur les génomes du panel 1. La présence d'un carré noir indique la présence d'un spacer. Les cases noires correspondent à la présence de gène cas et les cases rouges indiquent la présence d'IS6110, en accord avec les résultats du travail précédent sur leur recherche. .... 133

**Figure 28** : Arbre phylogénétique circulaire de 98 génomes (Panel 1 et génomes complets) de *M. bovis*. Les deux génomes de référence, Mb3601 et AF2122/97 sont marqués en bleu. Les 10 nouveaux génomes complets sont indiqués en rouge. L'arbre phylogénétique est basé sur 7023 polymorphismes nucléotidiques simples du génome entier. .... 138

## Liste des annexes

- Annexe 1** : Tableau présentant les informations des génomes de *Mycobacterium bovis* utilisés dans cette étude dans le panel 1. Les 87 génomes proviennent d'un travail précédent (Hauer et al., 2019). Le nom des génomes est surligné d'une couleur permettant de les distinguer à l'intérieur d'un groupe de *M. bovis* précédemment défini. En Jaune le Cluster I/Complexe clonal Eu3. En orange le Cluster G/Famille F9. En marron le Cluster C/Famille SB0134. En violet le Cluster D/Complexe clonal Eu1. En rose le Cluster A/Famille F4. En bleu le Cluster F/Complexe clonal Eu2. En gris, les autres..... 177
- Annexe 2** : Tableau présentant les informations des génomes de *Mycobacterium bovis* utilisés dans cette étude dans le panel 3. Les 187 génomes sont de génotypes F7 et F15 (respectivement SB0821 et SB0832) qui sont deux génotypes très proches. Ces génomes avaient déjà été séquencés avant le début du travail de thèse. Certains ont été publiés avec le travail de Duault et collaborateur et d'autres ne l'ont pas encore été (noté NA) (Duault et al., 2022)..... 177
- Annexe 3** : Tableau présentant les informations des génomes de *Mycobacterium bovis* utilisés dans cette étude dans le panel 4. Les 227 génomes sont de génotypes SB0120-DHV. Ces génomes avaient déjà été séquencés avant le début du travail de thèse, mais ne sont actuellement pas publiés (noté NA dans les colonnes "Date de dépôt" et "Bio-échantillon Genbank")..... 177
- Annexe 4** : Position des sites d'insertions IS6110 dans le panel de souche de *Mycobacterium bovis* de Pyrénées-Atlantiques (SB0821 et SB0832). Position du début et de la fin de l'IS6110 sont déterminés avec l'outil ISMapper et le génome de référence AF2122/97..... 177
- Annexe 5** : Position des sites d'insertions IS6110 dans le panel de souche de *Mycobacterium bovis* de SB0120-DHV. Position du début et de la fin de l'IS6110 sont déterminés avec l'outil ISMapper et le génome de référence Mb3601. .... 177
- Annexe 6** : Cette figure provenant du rapport de stage de Modenesi représente un arbre phylogénétique consensus circulaire de 300 souches de SB0120-DHV (Modenesi 2019). Les souches du panel 3 font parties de ces 300 souches et ont été sélectionné selon la qualité de séquençage de celle-ci ce qui explique le nombre plus petit de souches retenues (227). Cet arbre est divisé en 11 clades de couleur différente. Les valeurs de probabilité postérieures (qui correspondent à la probabilité que ces clades soient vrais) déterminées avec Beast (Drummond and Rambaut, 2007) sont représentées à l'intérieur de l'arbre. 177



La tuberculose bovine (bTB) notamment due à *Mycobacterium bovis*, est l'une des maladies infectieuses du bétail les plus importantes et les plus répandues dans le monde, malgré des décennies de programmes de contrôle et d'efforts de recherche. En raison du caractère zoonotique de cette maladie et des importants problèmes économiques et sociologiques qu'elle induit, la tuberculose animale constitue une grande préoccupation pour les secteurs de la santé publique humaine et vétérinaire. La tuberculose bovine illustre parfaitement comment la modification des écosystèmes par les pratiques humaines peut conduire à la création de réservoirs complexes, influencer la transmission et la propagation de la maladie et entraver les programmes de contrôle et d'éradication. En 2001, la France a obtenu le statut indemne de bTB, cependant une réémergence de la maladie est constatée dans notre pays depuis 2003. L'objectif de ce projet de thèse est d'améliorer nos connaissances génomiques des souches de *M. bovis* majoritairement retrouvées en France ces dernières années par l'acquisition et la description de 10 nouveaux génomes complets représentatifs des groupes de *M. bovis*, mais également en étudiant l'abondance et l'implication génétique d'IS6110 dans les génotypes français.

Cette thèse s'est déroulée au sein du Laboratoire National de Référence Tuberculose, dans l'Unité Zoonoses Bactériennes (UZB) du Laboratoire de Santé Animale (LSAN) de Maisons-Alfort de l'Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) à Maisons-Alfort. Ce projet a également été réalisé dans l'équipe Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance (PGBA) de l'Unité Mixte de Recherche Infectiologie et Santé Publique (UMR ISP 1282) de l'Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAe) à Nouzilly.

Ce travail de thèse a été co-dirigé par María Laura Boschioli, directrice de recherche dans à l'ANSES, et Franck Biet, directeur de recherche à INRAe, ainsi qu'encadré par Lorraine Michelet, chargée de projets de recherche à l'Anses.

Ce projet a été financé conjointement par l'ANSES et un programme européen une seule santé OHEJP (« *One Health European Joint Programme* » en anglais).

## **1. Introduction**

## **1.1. L'agent de la tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis***

### **1.1.1. Les mycobactéries**

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies, à Gram positif, acidophiles, non mobiles, droits ou légèrement incurvés, qui ne forment pas d'endospores, d'une taille de 1 à 20 µm de long et 0.2 à 0.6 µm de large. Plus de 200 espèces et sous-espèces de mycobactéries ont été décrites au moment de la rédaction de ce manuscrit (Parte et al., 2020). L'ensemble des mycobactéries fait partie de la famille des *Mycobacteriaceae* (Figure 1) qui n'est composée que d'un seul genre, *Mycobacterium* (Euzéby, 1997).

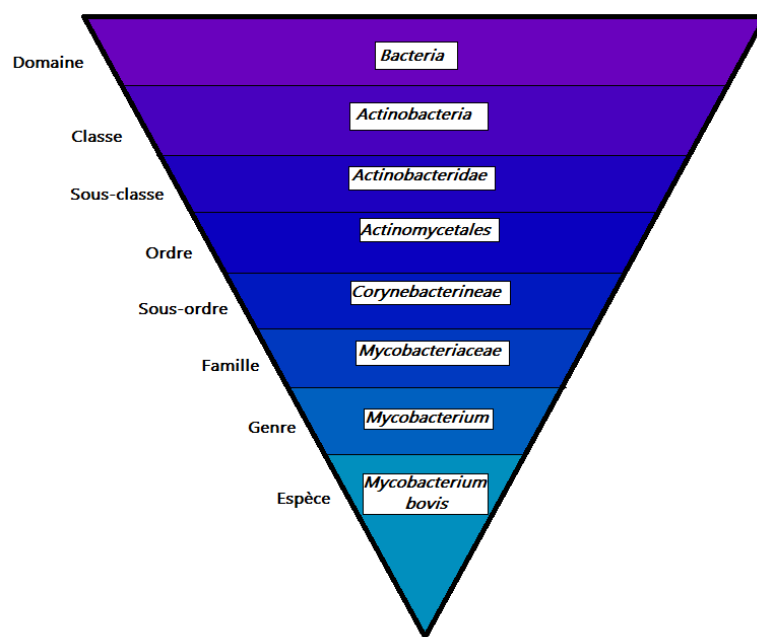


Figure 1 : Classification de *Mycobacterium bovis*.

La composition de leur paroi cellulaire, extrêmement riche en lipides et à forte teneur en acides mycoliques, est une caractéristique phénotypique distinctive de ces micro-organismes qui leur permet de survivre dans l'environnement pendant de longues périodes de temps (Duffield and Young, 1985; Fine et al., 2011).

Ces caractéristiques confèrent aux mycobactéries la propriété de ne pas être décolorées sous l'action d'acides forts ou d'alcool, ce qui permet de les identifier lors de coloration au Ziehl-Nielsen et de le caractériser comme des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) (Figure 2).

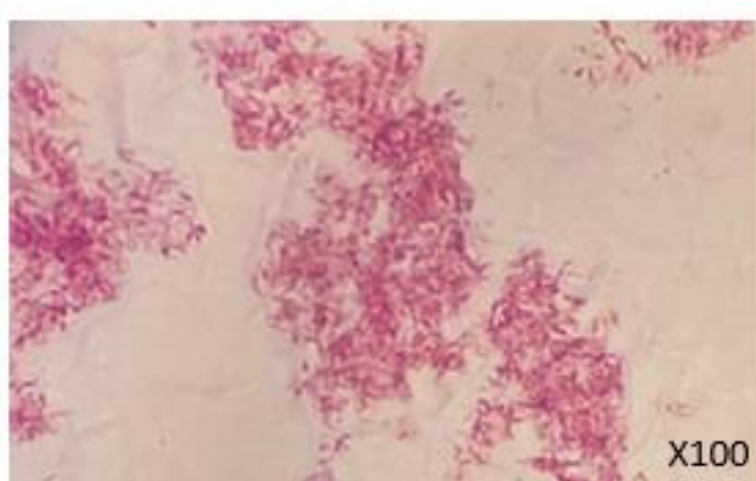


Figure 2 : Coloration au Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium bovis*, observé avec une goutte d'huile au grossissement \*100. L'observation montre des bacilles roses correspondant à cet agent (obtenu au cours des travaux de thèse).

La croissance des mycobactéries est très variable selon l'espèce. Une classification est d'ailleurs faite, distinguant les mycobactéries à croissance rapide de celles à croissance lente. Les mycobactéries à croissance rapide, comme *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* ou *Mycobacterium smegmatis*, ont un temps de génération de 2 à 5 heures et forment des colonies visibles en moins de 7 jours (Bourgoin and Agius, 1995). Les mycobactéries à croissance lente ont un temps de génération moyen plus long de 14 à 15h pour *M. tuberculosis* ou de 20h pour *M. bovis*.

La classification des différentes espèces de mycobactéries peut également se faire selon leur intérêt clinique. Ainsi, elles peuvent être regroupées en trois groupes : les mycobactéries pathogènes obligatoires, les mycobactéries opportunistes ou pathogènes potentielles et les mycobactéries saprophytes ou non pathogènes (Forbes et al., 2018; Schulze-Röbbecke, 1993). D'autres classifications existent comme la distinction entre les membres du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ou atypiques (Rindi and Garzelli, 2016; Runyon, 1965). Une récente étude de phylogénomique et génomique comparative qui portait sur 150 génomes de mycobactéries a montré l'existence de cinq groupes monophylétiques distincts au sein du genre : les clades "*Tuberculosis-Simiae*", "*Terrae*", "*Triviale*", "*Fortuitum-Vaccae*" et "*Abscessus-Chelonae*" (Gupta et al., 2018). Cette étude a soutenu la subdivision du genre *Mycobacterium* en cinq nouveaux genres : *Mycobacterium* pour le clade *Tuberculosis-Simiae*, *Mycolicibacterium gen. nov* correspondant au clade *Fortuitum-Vaccae*, *Mycolicibacter gen. nov* pour le clade *Terrae*, *Mycolicibacillus gen. nov* pour le clade *Triviale* et *Mycobacteroides gen. nov* pour le clade *Abscessus-Chelonae* (Gupta et al., 2018).

Cette nouvelle classification a créé une certaine confusion dans la communauté scientifique et n'apporte aucun bénéfice au domaine de la mycobactériologie ; l'utilisation de l'ancienne nomenclature des MNT peut rester inchangée (Tortoli et al., 2019a). Par ailleurs, en utilisant les données de séquençage du génome complet (WGS), 174 taxons dans le genre *Mycobacterium* ont été décrits (Tortoli et al., 2019b).

### **1.1.2. Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) et les agents de lèpre**

Les mycobactéries saprophytes ou commensales sont généralement considérées comme non pathogènes pour l'homme et sont présentes dans divers substrats environnementaux comme l'eau, la terre, la poussière ou les plantes. Certaines de ces bactéries à croissance rapide comme *Mycobacterium vaccae* ou *Mycobacterium smegmatis* sont des bons modèles pour étudier des caractéristiques génomiques ou l'écologie des membres du genre *Mycobacterium* sans devoir utiliser des bactéries pathogènes à croissance lente comme *M. bovis* ou *M. tuberculosis* (Amoroso et al., 2020; Ealand et al., 2018; Reyrat and Kahn, 2001; T et al., 2020). D'autres études évaluent le potentiel de protection que pourraient apporter ces mycobactéries en tant que vaccin contre la tuberculose (TB) comme les vaccins candidats MIP/Mw, Utilins, *M. smegmatis* ou Vaccae<sup>TM</sup> utilisant des agents inactivés (respectivement *Mycobacterium indicus pranii*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium vaccae*) (Gong et al., 2018, 2020; Junqueira-Kipnis et al., 2013).

Les mycobactéries pathogènes opportunistes sont également retrouvées dans l'environnement et elles ont un pouvoir pathogène pour l'homme et les animaux qui varie en fonction des espèces (Ingen et al., 2009). Pendant longtemps, aucune attention particulière n'a été portée à ces mycobactéries, du fait de leur pouvoir pathogène faible et de l'importance de l'épidémie de TB. Néanmoins, une augmentation des cas d'infection par ces mycobactéries a été observée au cours de ces dernières années, surtout dans les pays industrialisés (Falkinham, 2016). Ces mycobactéries sont assez résistantes aux désinfectants de l'eau couramment utilisés, tels que le chlore, et leur capacité à persister dans les approvisionnements urbains en eau peut contribuer à la prévalence croissante des maladies pulmonaires liées aux mycobactéries opportunistes (Falkinham et al., 2015).

Ces bactéries peuvent causer de graves complications lorsqu'elles sont combinées à d'autres agents de maladies pulmonaires comme la mucoviscidose. En effet, le taux d'infection, notamment par *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus*), des patients atteints de mucoviscidose a augmenté dans le monde ces dernières décennies (Aitken et al., 2012; Bryant et al., 2016, 2013; Floto et al., 2016; Thomson et al., 2020).

Les agents mycobactériens opportunistes les plus fréquents chez des patients appartiennent au complexe de *Mycobacterium avium* (MAC) avec principalement, *Mycobacterium avium* subsp (sous espèce « *subspecies* » en anglais) *hominissuis* (Mah) et *Mycobacterium intracellulare* (Hoefsloot et al., 2013; Whiley et al., 2012). Il peut également être mentionné *Mycobacterium ulcerans*, l'agent de l'ulcère de Buruli, qui est la deuxième maladie mycobactérienne la plus répandue en Afrique (Dhungel et al., 2021; Fevereiro et al., 2021).

Certaines de ces mycobactéries environnementales sont donc classées comme agents pathogènes opportunistes, mais peuvent avoir des implications vétérinaires et sanitaires importantes. Les mycobactéries pathogènes d'importance vétérinaire à mentionner sont principalement *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) qui est l'agent de la paratuberculose, également connue comme la maladie de Johne (Biet et al., 2005; Momotani et al., 2012; Rowe and Grant, 2006), chez des ruminants. Une autre mycobactérie qui appartient également au complexe MAC est *M. avium* subsp *avium*, l'agent de la tuberculose aviaire, aussi bien chez les oiseaux de rente ou domestiques que sauvages (Algammal et al., 2021; Dhama et al., 2011). Les mycobactéries opportunistes ou pathogènes peuvent être responsables de réactions positives lors d'un test de dépistage de la tuberculose (TB) par tuberculation, aussi bien chez les humains que chez les animaux, mais ne font pas l'objet de déclaration obligatoires. (Karakousis et al., 2004; Kuenstner et al., 2017; Rindi and Garzelli, 2016; Runyon, 1965).

*Mycobacterium leprae* est un agent pathogène strict ou obligatoire pour les humains provoquant la lèpre. Ce bacille est également connu sous le nom de bacille de Hansen en l'honneur du bactériologiste norvégien Gerhard Armauer Hansen qui l'a découvert en Norvège en 1873. D'autres agents de lèpre ont été décrits, notamment *Mycobacterium lepromatosis* qui provoque une lèpre lépromateuse diffuse chez l'humain ou *Mycobacterium lepraemurium* qui est responsable de la lèpre murine (Rojas-Espinosa and Løvik, 2001; Sharma et al., 2019).

### **1.1.3. Le complexe de *Mycobacterium tuberculosis***

Le groupe des mycobactéries pathogènes contient également les membres du MTBC. Ils peuvent provoquer la tuberculose chez les humains et/ou chez les animaux.

La TB est une maladie infectieuse chronique causée par les agents du MTBC avec notamment, l'agent principal de la tuberculose humaine, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). La TB a été décrite dès l'antiquité par plusieurs auteurs comme une maladie amaigrissante appelée « Phtisie » et provoquant des symptômes d'insuffisance respiratoire.

L'origine de la tuberculose humaine semble dater de la période du Néolithique où des traces de TB ont été retrouvées dans les premières populations humaines d'Afrique datant d'au moins 70 000 ans (Buzic and Giuffra, 2020; Comas et al., 2013). Le terme « tuberculose » a été utilisé pour la première fois par le médecin Johann Lukas Schönlein en 1839. Son nom vient du latin *tuber* signifiant excroissance et du fait que la maladie se caractérisait par des tubercules (Murray et al., 2014).

En 1865, le médecin Jean-Antoine Villemin montra que cette maladie était due à un microbe qui se transmettait par voie aérienne. Dans son étude, il montra que le microbe pouvait se transmettre d'humains au lapin, du bétail au lapin, du lapin au cochon d'Inde et entre lapins. Ainsi, le potentiel zoonotique de la TB fut mis en évidence, de même que le fait que la maladie était transmissible par un micro-organisme spécifique (Villemin 1865). Les travaux de Villemin, qui ont été très décriés à l'époque, furent ensuite repris en 1882 par le microbiologiste Robert Koch. Il répéta l'infection de TB entre le lapin et le cochon d'Inde avec du matériel infectieux isolé d'humains, puis isola la souche infectieuse, appelée bacille de Koch (BK), sur un milieu de culture (Koch, 1982). La découverte de *M. tuberculosis* lui valut le prix Nobel de médecine en 1905. Le bactériologiste et hygiéniste Carl Flügge montra par la suite en 1897 que le bacille pouvait se transmettre par des gouttelettes produites lors de la toux (« *Flügge droplets* »).

Les membres MTBC ont une similarité très forte entre eux, avec une homologie de 99% de leur ADN (acide désoxyribonucléique) génomique (Figure 3) (Brosch et al., 2002; Rodriguez-Campos et al., 2014; Supply et al., 2013). Néanmoins, il est possible d'identifier et de classer les membres de ce groupe selon des caractéristiques dues à des événements génétiques comme la présence de délétion ou d'insertion (indels) spécifiques nommées des Régions de Différences (RD) qui permettent ainsi de différencier les membres du MTBC (Figure 3).

Neuf lignées ont été définies à l'intérieur du MTBC. *M. tuberculosis* est présente dans les lignées L1 à L4 et L7 tandis que les lignées L5 et L6 correspondent à *Mycobacterium africanum* (respectivement *M. africanum* 1 et *M. africanum* 2). L8 et L9 ont été définies récemment, la première lignée décrit un nouveau clade entre *M. canettii* et les autres lignées du MTBC et L9 comprenant une lignée de souches de *M. africanum* isolées de Somalie (Coscolla et al., 2021; Ngabonziza et al., 2020; Silva et al., 2022). Les clades A1 à A4 contiennent les agents de la tuberculose animale (Coscolla et al., 2021; Napier et al., 2020; Noel H. Smith et al., 2009; Streicher et al., 2007; Stucki et al., 2016).



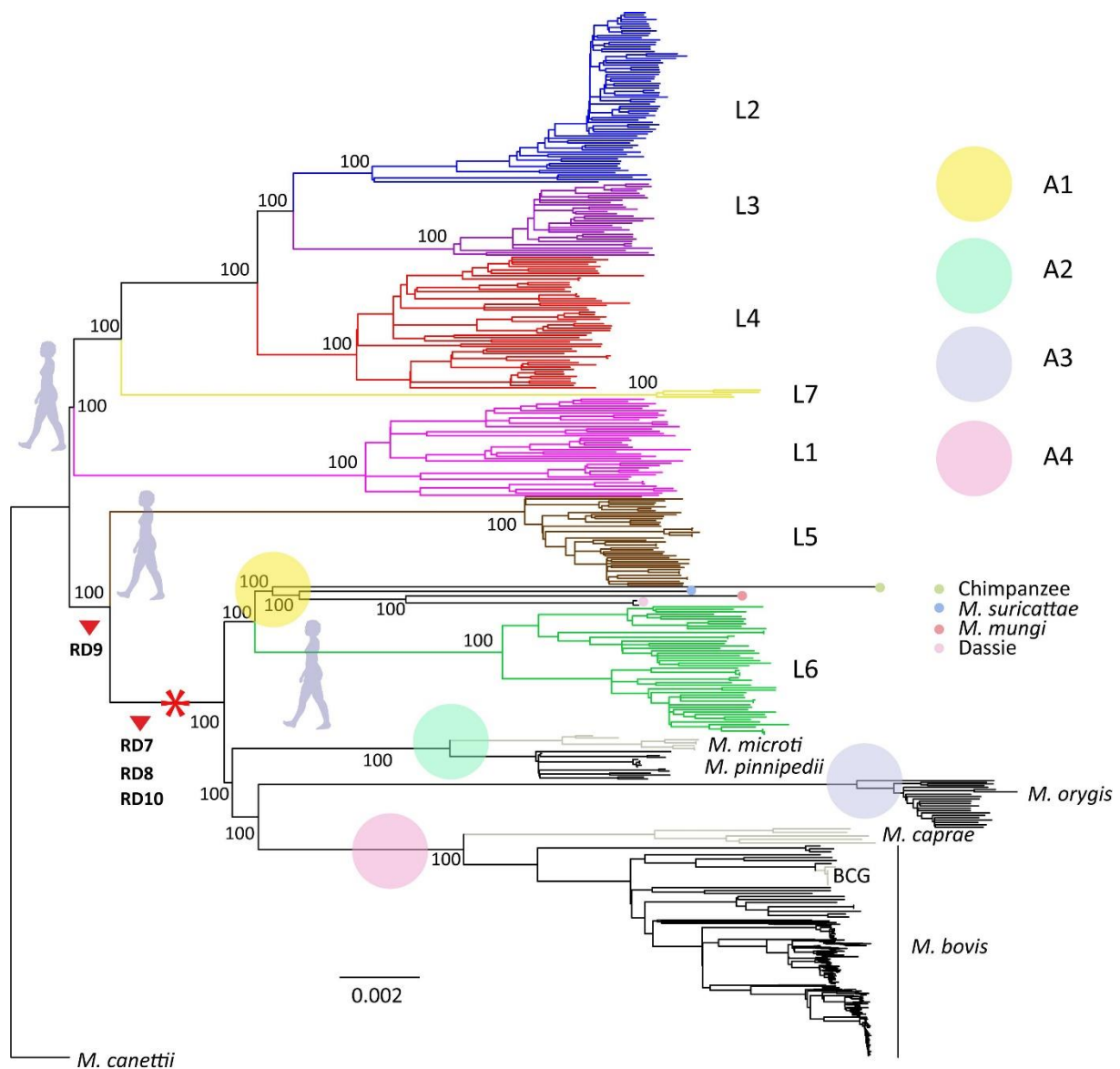


Figure 3 : Phylogénie de maximum de vraisemblance de souches du MTBC. L'astérisque marque l'expansion de la gamme d'hôtes au sein du MTBC. Les lignées L1 à L7 contiennent les agents de la tuberculose humaine tandis que les clades A1 à A4 contiennent les agents de la tuberculose animale. L'arbre a été enraciné avec *Mycobacterium canettii*. Cette figure provient de l'article de Brites et collaborateurs (Brites et al., 2018).

### 1.1.3.1. Les membres humains du MTBC

Le MTBC est donc composé d'agents de tuberculose humaine comme *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. canettii*. Ces trois agents provoquent peu de cas zoonotiques et ont été majoritairement isolés en Afrique d'où ils semblent être originaires (Figure 4) (Blouin et al., 2014; Cardona et al., 2020; Frothingham et al., 1999; Gutierrez et al., 2005; Jong et al., 2010; Noel H. Smith et al., 2009; Vasconcellos et al., 2010). Il est admis que les anciennes souches de MTBC proviennent de mycobactéries environnementales appelées bacilles lisses de la TB (comme *M. canettii* ou *M. pseudotuberculosis*) et qu'elles ont acquis au cours du temps des éléments de pathogénicité envers l'homme (Delogu et al., 2013; Supply et al., 2013).

### 1.1.3.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* est l'agent principal de la TB humaine. La transmission de cet agent pathogène a été montrée chez des animaux domestiques comme des caprins (Cadmus et al., 2009), des suidés (Arega et al., 2013), des canidés (Erwin et al., 2004; Hackendahl et al., 2004) et des bovins (Ameni et al., 2013; Ocepek et al., 2005; Romero et al., 2011), mais aussi chez certains animaux sauvages notamment en captivité comme des éléphants (Michel et al., 2013; Oh et al., 2002), des rhinocéros (Oh et al., 2002) et des primates non humains (Oh et al., 2001; R.j et al., 2001).

La TB est la plus grande cause de décès due à une maladie infectieuse de l'histoire, dépassant la variole, le paludisme, la grippe, la peste et le SIDA combiné (Paulson, 2013). Bien que cette maladie soit ancienne, elle est toujours très présente avec environ 10 millions de personnes tombées malades en 2020, soit une incidence de 127 cas pour 100 000 habitants, selon les données du rapport « Global Tuberculosis reports » de 2021 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). La TB est présente partout dans le monde (Figure 4) et représente aujourd'hui la deuxième plus grande cause de mortalité due à un agent infectieux (derrière le virus de la COVID-19) avec 1,3 million de morts.

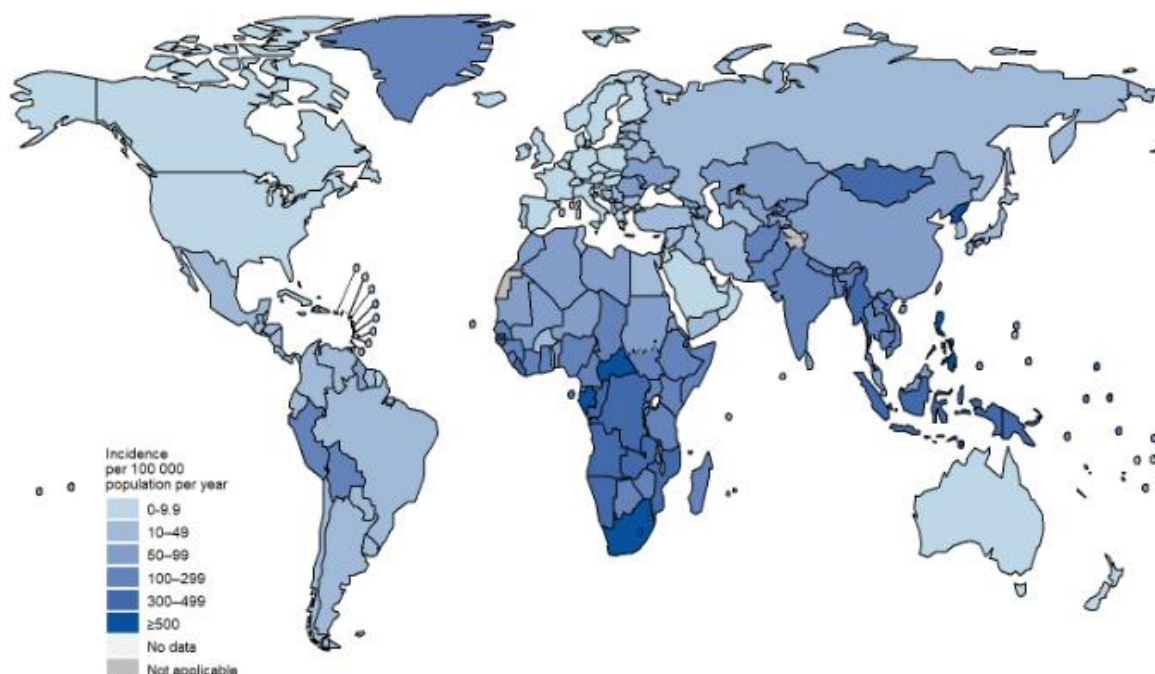


Figure 4 : Incidence de la tuberculose en 2020 dans le monde. Cette figure provient du rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) « Global Tuberculosis reports » de 2021.

Il existe deux formes de TB. La première est la tuberculose active pendant laquelle le bacille se multiplie et la maladie se développe. Cette forme, observée chez 10% des personnes infectées, survient lorsque le système immunitaire du sujet infecté est défaillant (Palomino et al., 2007). La deuxième forme, qui est la plus répandue, est la tuberculose latente qui est celle où l'infection est contenue et n'engendre pas de signes cliniques, ce qui rend sa détection et donc son éradication compliquée. Il est généralement possible de guérir de la TB en 6 mois en prenant quotidiennement un cocktail d'antibiotiques composé de rifampicine, d'isoniazide, de pyrazinamide et d'éthambutol pendant 2 mois, puis un cocktail de rifampicine et d'isoniazide pendant 4 mois. Néanmoins, la mauvaise gestion du traitement antituberculeux (utilisation à mauvais escient ou incorrecte des antimicrobiens, administration de formules inefficaces ou arrêt prématuré du traitement) peut sélectionner des bacilles résistants aux antimicrobiens utilisés (R), multi-résistants (MDR) ou ultrarésistants (XDR) ce qui aggrave ce problème de santé publique.

Le séquençage du génome de la souche de référence de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en 1998 a permis d'améliorer les connaissances sur cet agent pathogène, mais également sur les autres mycobactéries, car il est le premier génome séquencé de ce genre (Cole et al., 1998).

#### **1.1.3.1.2. *Mycobacterium africanum***

*M. africanum* a été découverte en 1968 (Castets et al., 1968) et a été définie comme le bacille tuberculeux africain avant d'être reclassifié comme une espèce à part entière un an plus tard. On retrouve cette espèce le plus souvent dans les pays d'Afrique de l'Ouest où on estime qu'elle est responsable de 40% des cas de tuberculose pulmonaire et n'est retrouvée que sporadiquement dans d'autres régions (Jong et al., 2010). Il est considéré que *M. africanum* a une capacité moins importante à provoquer une tuberculose active, avec un taux de transmission plus faible que par rapport à *M. tuberculosis* (Asare et al., 2018; de Jong et al., 2008; Eldholm et al., 2021; Nebenzahl-Guimaraes et al., 2015; Sharma et al., 2016). Comme montré précédemment, *M. africanum* est séparé en deux types, le type 1 (MAF1), prévalent dans le golfe de Guinée et le type 2 (MAF2) qui est prévalent en Afrique de l'Ouest Occidentale (Frothingham et al., 1999; Vasconcellos et al., 2010). Les membres de ce groupe partagent la délétion RD9. MAF1 possède une autre délétion RD711, tandis que MAF2 peut être identifié par les délétions de RD702, 7, 8 et 10 (Figure 5) (de Jong et al., 2005). En utilisant le spoligotypage (1.2.3.2. **Le spoligotypage**), MAF1 est caractérisé par une perte des espaceurs

(spacer) 8-12 et 37-39, tandis que dans MAF2, les spacer 7-9 et 39 sont absents (de Jong et al., 2010).

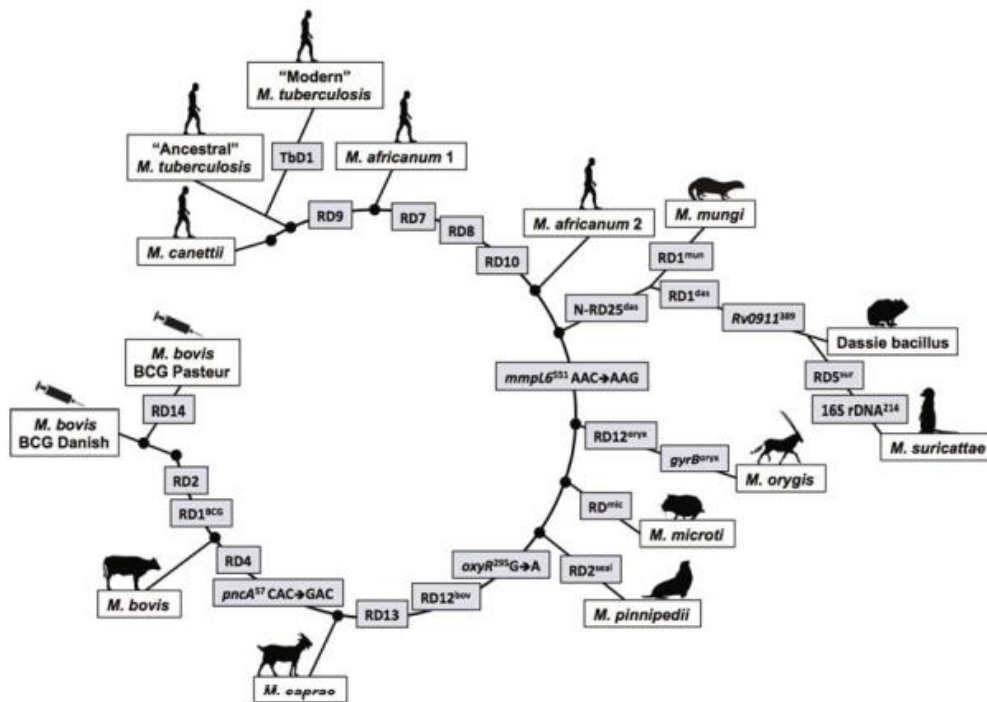


Figure 5 : Représentation schématique des marqueurs moléculaires (SNP et RD) qui distinguent les espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Cette figure décrit plus particulièrement les membres responsables de la tuberculose animale. Les silhouettes d'animaux illustrent l'hôte principal auquel le membre de MTBC est associé. Les siringues indiquent la présence d'une souche vaccinale (Gagneux, 2017).

### 1.1.3.1.3. *Mycobacterium canettii*

*M. canettii* a été isolée pour la première fois en 1969 par le microbiologiste français Georges Canetti (Supply et al., 2013). Ce bacille tuberculeux lisse, en contraste avec les autres membres de MTBC, fait bien partie du MTBC même s'il en est le plus éloigné au niveau génotypique et phénotypique (Goh et al., 2001; Koeck et al., 2011; Soolingen et al., 1997). *M. canettii* n'a d'ailleurs été rattachée à ce groupe qu'en 1997 (Soolingen et al., 1997). Elle a été principalement isolée chez des patients originaires d'Afrique et en particulier dans la Corne de l'Afrique (Blouin et al., 2014; Bouzid et al., 2018; Pfyffer et al., 1998). Malgré de nombreux cas, il n'a pas été possible de déterminer d'hôtes réservoir pour ce micro-organisme bien qu'un réservoir environnemental soit suggéré au vu de l'absence d'observation de transmission inter-humaine (Blouin et al., 2014; Fabre et al., 2004; Koeck et al., 2011). Une première étude a émis l'hypothèse que certaines plantes endémiques de la Corne de l'Afrique pourraient être une niche écologique de cet agent pathogène (Loukil et al., 2019). D'autres études devront encore être réalisées pour déterminer le ou les réservoirs de *M. canettii*. Un des problèmes de ce pathogène

est qu'il ne partage pas la même sensibilité aux antibiotiques que *M. tuberculosis*, pouvant alors entraîner de ce fait des erreurs de diagnostic et la sélection de souches résistantes aux traitements (Feuerriegel et al., 2013; Koeck et al., 2011).

Le premier séquençage du génome de *M. canettii* a été réalisé en 2011 sur la souche CIPT 140010059. Ce bacille se caractérise par la perte d'une région RD spécifique (RDca) et par une mutation spécifique sur *hsp65* (heat shock protein 65) (Supply et al., 2013).

### **1.1.3.2. Les agents de la tuberculose animale**

#### **1.1.3.2.1. Les membres du clade A1**

Quatre agents de la tuberculose animale ne sont pas présents dans les clades A2, A3 ou A4, mais sont proches des lignées 5 et 6 correspondant à *Mycobacterium africanum* et sont présent dans le clade A1 (Figure 3 et Figure 5) (Coscolla et al., 2021, 2013). Il est composé par :

- le Dassie bacillus qui a été isolé pour la première fois en 1954 en Afrique du Sud chez le daman de montagne (*Hyracoidea Procavia capensis*) d'où il tire son nom (« dassie » en anglais) (Wagner et al., 1958). La première caractérisation de cet agent pathogène a montré qu'il était très similaire à *Mycobacterium microti* (*M. microti*) (décrite dans la partie 1.1.3.2.4. **Mycobacterium microti**). Néanmoins des évènements de délétion ont été déterminés comme RD5<sup>das</sup>, RD25<sup>das</sup> et RD1<sup>das</sup> qui représentent la délétion d'une région codant pour les composants du système de sécrétion ESX-1 (Figure 5) (Mostowy et al., 2004).

- *Mycobacterium suricattae*, dont la première observation a été faite chez les suricates (*Suricata suricatta*) dans les années 1990, a dans un premier temps été confondu avec *M. tuberculosis* (Alexander et al., 2002), puis *M. bovis* (Drewe et al., 2009). Cet agent a ensuite été décrit en tant que nouveau membre du MTBC en 2013 (Parsons et al 2013). Les suricates vivent en groupe et interagissent fortement entre eux, pouvant ainsi favoriser la transmission de cet agent pathogène (Drewe, 2009; Drewe et al., 2009). Ce bacille partage les évènements génétiques de délétion RD25<sup>das</sup> et RD1<sup>das</sup>, décrits chez le Dassie bacillus, mais il peut être distingué de ce dernier par la délétion de RD5<sup>sur</sup> qui est spécifique à *M. suricattae* (Figure 5) (Parsons et al., 2013).

- Mycobacterium mungi* a été découverte en 2000 et isolée en 2010 au Botswana chez les mangoustes rayées (*Mungos mungo*), espèce chez laquelle la bactérie cause un fort taux de mortalité (Alexander et al., 2010). Cet agent pathogène partage une délétion, RD25<sup>das</sup>, avec la Dassie bacillus mais peut être différencié de ce dernier avec une délétion additionnelle de RD1, appelé RD1<sup>mun</sup>. (Figure 5).

- le *Chimpanzee bacillus* a été découvert chez un chimpanzé dans l'ouest de l'Afrique alors que les autres membres du clade A1 sont plutôt retrouvés dans plusieurs pays d'Afrique du Sud (Coscolla et al., 2013). Les connaissances sur ce bacille sont très limitées.

#### **1.1.3.2.2. *Mycobacterium pinnipedii***

*Mycobacterium pinnipedii* (*M. pinnipedii*) est un agent de tuberculose animale présent dans le clade A2 (Figure 4 et Figure 5). Ce bacille a été décrit pour la première fois en 1991 chez des otaries d'Australie et de Nouvelle-Zélande (Cousins et al., 1994; Forshaw and Phelps, 1991). Il a été appelé *M. pinnipedii* en 2003 (Cousins et al., 2003). Des infections à *M. pinnipedii* ont également été décrites chez le tapir, le bovin, le lama, le gorille mais aussi chez les humains, principalement chez des soigneurs en contact avec des animaux infectés (Kiers et al., 2008; Moser et al., 2008; Thompson et al., 1993), ce qui permet de considérer cette bactérie comme zoonotique. *M. pinnipedii* a en effet été retrouvée sur des dépouilles de momies péruviennes de plus de 1 000 ans (Salo et al., 1994). Le génome de cet agent pathogène comporte une délétion spécifique PiD1 qui permet de le distinguer des autres membres du MTBC (Bigi et al., 2005).

#### **1.1.3.2.3. *Mycobacterium caprae***

Cette espèce a été identifiée en 1999 à partir d'un isolat de chèvre (Aranaz et al., 1999). *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) a d'abord été identifié comme étant *M. tuberculosis* subsp *caprae*, puis en 2003 elle a été élevée au rang d'espèce, devenant *M. caprae* (Aranaz et al., 2003). Si les hôtes préférentiels de cet agent pathogène sont les caprins (Bezoz et al., 2012), il est aussi capable d'infecter des bovins (Cvetnic et al., 2007), des cervidés (Chiari et al., 2014), des ovins (Pesciaroli et al., 2014) mais également des bisons (Pate et al., 2006), des tigres (Lantos et al., 2003), des lapins (Sevilla et al., 2020). Les humains peuvent également être infectés par *M. caprae* par contact direct ou consommation de produit contaminé (lait ou viande par exemple) (Torres-Gonzalez et al., 2013). Ce bacille est surtout présent en Espagne où il est responsable de 0.3% des cas de TB humaine, mais également dans d'autres pays d'Europe de l'Ouest (notamment la France) et Centrale.

*M. caprae* provoque des lésions macroscopiques semblables à celles de la tuberculose provoquée par *M. bovis* (décrite plus loin 1.1.3.2.7. *Mycobacterium bovis*) et elle peut être identifiée grâce à des caractéristiques génétiques spécifiques (Domogalla et al., 2013; Huard et al., 2003; Rettinger et al., 2017). Une récente publication basée sur le WGS a permis de séparer *M. caprae* en 2 sous-lignées distinctes (Shea et al., 2022). Cette bactérie a également un impact

économique fort puisqu'avec *M. bovis* et *M. tuberculosis*, elle fait partie de la liste des agents de tuberculose réglementé.

Le premier génome complet de *M. caprae* a été obtenu en 2015 (de la Fuente et al., 2015). RD12 et RD13 permettent de différencier *M. caprae* et *M. bovis* du reste des membres de MTBC, tandis que des polymorphismes dans RD4 permettent de distinguer *M. caprae* de *M. bovis* (Figure 5) (Aranaz et al., 2003, 1999; Brosch et al., 2002; Garnier et al., 2003; Rettinger et al., 2017).

#### **1.1.3.2.4. Mycobacterium microti**

Ce bacille a été découvert en 1937 au Royaume-Uni. Il est l'agent principal de la tuberculose chez les rongeurs et en particulier chez le campagnol qui est son hôte principal (Elton et al., 1935; Wells, 1937). Il peut également être sporadiquement trouvé chez de nombreuses espèces, dont les humains chez lesquels une trentaine de cas d'infection à *M. microti* ont été déclarés en Europe entre 1998 et 2010 (Panteix et al., 2010). Les personnes infectées sont généralement immunodéprimées, mais l'infection a déjà été rencontrée chez des personnes immunocompétentes (Emmanuel et al., 2007; Frank et al., 2009; Niemann et al., 2000). Il a été montré que *M. microti* pouvait être retrouvée chez les animaux sauvages tels que des sangliers, des cervidés, des blaireaux, des renards (Chiari et al., 2015; Ghielmetti et al., 2021; Michelet et al., 2021, 2016, 2015a; Tagliapietra et al., 2021) et domestiques comme les chats et les chiens (Deforges et al., 2004; Gunn-Moore et al., 1996; Michelet et al., 2020a, 2016, 2015b; Peterhans et al., 2020; N. H. Smith et al., 2009) ou encore certains animaux de rente comme les porcs, les chèvres, les lamas ou les bovins (Michelet et al., 2016). Il a également été montré que cet agent pathogène pouvait être endémique dans certaines régions de France (surtout dans le sud et le centre de la France) (Laprie et al., 2013; Michelet et al., 2015b). L'analyse par spoligotypage (voir partie 1.2.3.2. **Le spoligotypage**) a permis de définir deux types majoritaires de cet agent pathogène : le type *vole* (pour campagnol en anglais) et le type *llama* (pour lama en anglais) (Horstkotte et al., 2001; van Soolingen et al., 1998). La comparaison de *M. microti* avec le génome de référence de *M. tuberculosis*, H37Rv, a permis de mettre en évidence de nombreuses RD comme RD5<sup>mic</sup>, MiD1, MiD2, MiD3 et RD1<sup>mic</sup> (Figure 5) (Frota, 2004). Cinq génomes complets de type *vole* ont récemment été assemblés et mis à disposition par le NCBI (Centre national d'information sur les biotechnologies), ce qui a permis de valider la présence des régions de différence retrouvées entre *M. microti* et *M. tuberculosis* et notamment la perte de RD1<sup>mic</sup> (Orgeur et al., 2021). Comme mentionné précédemment, cette région est importante pour la virulence des mycobactéries, car elle code pour les composants du système de sécrétion



ESX-1 et pourrait expliquer en partie sa faible virulence pour les humains (Orgeur et al., 2021; Pym et al., 2002).

#### **1.1.3.2.5. *Mycobacterium orygis***

*M. orygis* a longtemps été considéré comme un variant de *M. bovis* (J.R.B. Flamand et al., 1994; J. R. B. Flamand et al., 1994; Greth et al., 1994). Cet agent pathogène a été isolé en 1976 chez l'oryx (*Oryx bacillus*) (Lomme et al., 1976) avant d'être défini en 2006 comme une espèce à part entière grâce à la biologie moléculaire pour finalement être intégré au MTBC en 2012 (Huard et al., 2006; van Ingen et al., 2012). Ce bacille est surtout présent en Afrique et en Asie du Sud (Dawson et al., 2012; Marcos et al., 2017). Il est l'agent causal de la tuberculose chez l'oryx, mais a aussi été décrit chez des antilopes, des singes, des cerfs, des rhinocéros, des buffles, des bovins et chez les humains (Dawson et al., 2012; J. R. B. Flamand et al., 1994; Gey van Pittius et al., 2012; Helden et al., 2009; Lomme et al., 1976; Rahim et al., 2017; Thapa et al., 2016, 2015). Un premier génome complet de *M. orygis* a été obtenu récemment (Rufai et al., 2021). Son analyse a permis de mieux décrire cette espèce avec la détermination de caractéristiques génétiques spécifiques comme certains RD (RD12<sup>oryx</sup> par exemple) ou des polymorphismes mononucléotidiques (SNP pour *single nucleotide polymorphism* en anglais) (G→A dans *gyrB* à la position 113 par exemple) (Figure 5) (van Ingen et al., 2012).

#### **1.1.3.2.6. *Mycobacterium bovis* BCG**

Le seul vaccin utilisé contre la tuberculose humaine est le BCG. Ce vaccin bilié a été développé par le médecin Albert Calmette et le vétérinaire Camille Guérin (Bilié de Calmette et Guérin ou BCG). La souche originale de *M. bovis* dont le BCG est issu, a été isolée par Edmond Nocard en 1901 d'une vache atteinte de tuberculose mammaire, puis cette souche a été transférée à Calmette et Guérin (Oettinger et al., 1999). *M. bovis* BCG a été créée par atténuation lors de 230 passages successifs sur milieu à la pomme de terre, bilié et glycérolé. *M. bovis* BCG est depuis 1921 le vaccin contre la TB humaine (Mahairas et al., 1996) mais également chez l'animal. En effet, bien que des essais d'efficacité sur le terrain réalisés au début du XXe siècle aient démontré une efficacité partielle du BCG dans la lutte contre la tuberculose bovine (Griffin, 2000), et que des résultats de protection soient variables dans la faune sauvage (Lesellier et al., 2020; Palmer and Thacker, 2018), l'impossibilité d'utilisation d'autre type de mesures de contrôle efficace dans des pays à forte endémicité de la maladie chez les bovins et l'émergence de réservoirs sauvages de *M. bovis* ont suscité un regain d'intérêt pour l'utilisation de ce vaccin dans la lutte contre la tuberculose bovine.

Plusieurs souches de *M. bovis* BCG existent. En effet, à partir de 1924, la culture originale de la souche a été distribuée à divers laboratoires dans le monde (Oettinger et al., 1999). Plusieurs différences génétiques ont été identifiées entre les souches filles comme des SNP, des RD, des duplications et différents sites d'insertion d'une séquence d'insertion d'IS6110 (Abdallah et al., 2015; Behr et al., 1999; Brosch et al., 2007, 2000; Gordon et al., 1999; Mahairas et al., 1996; Mostowy et al., 2004; Salamon et al., 2000).

Beaucoup d'études ont été faites pour mieux comprendre la différence de virulence entre le BCG, *M. bovis* de terrain et *M. tuberculosis*. L'utilisation de matrices de chromosomes artificiels bactériens a permis de distinguer 14 RD entre la souche vaccinal de Pasteur et la souche de référence de *M. tuberculosis*, H37Rv (Figure 6) (Behr et al., 1999; Brosch et al., 2000, 1999; Gordon et al., 1999).

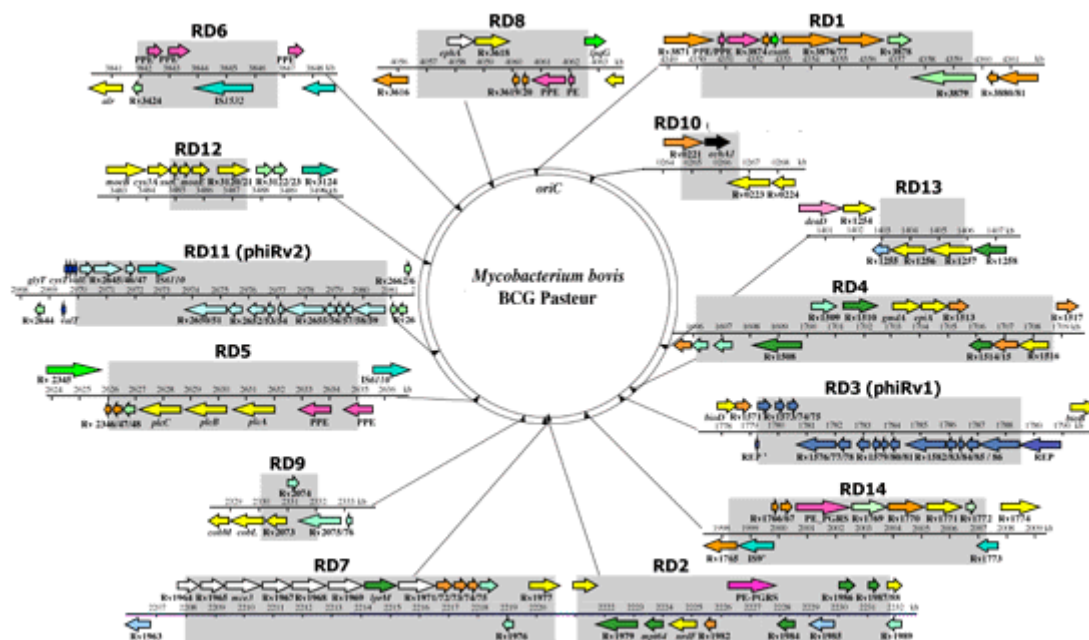


Figure 6 : Représentation du génome de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur avec les régions de différence (RD) en comparaison avec *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Pour chacun des RD mis en évidence, il peut être observé l'impact sur la délétion totale ou partielle de gènes. Cette représentation provient du site internet [http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/b\\_rilova/copia%20de%20proyectobio/futuro/pagswebfuturo/perdidascbg.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/b_rilova/copia%20de%20proyectobio/futuro/pagswebfuturo/perdidascbg.htm).

### 1.1.3.2.7. *Mycobacterium bovis*

Ce dernier membre du groupe MTBC est l'agent principal de la bTB. La présentation de *M. bovis* est développée plus en détail au cours de ce manuscrit.

#### **1.1.4. L'agent principal de la tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis***

##### **1.1.4.1. Un agent pathogène multi hôte**

La tuberculose bovine est une maladie infectieuse chronique dont l'agent principal est *M. bovis*, dont l'hôte principal est représenté par les bovins. Néanmoins, la transmission et le maintien de l'infection de *M. bovis* dans une population sont facilités par le caractère multi-hôtes de ce pathogène qui peut infecter de nombreuses espèces de mammifères :

- des **animaux de rente** comme les bovins, les ovins, les caprins mais également les lamas ou les alpagas (Barlow et al., 1999; T. Crawshaw et al., 2008; D'Alterio et al., 2006; Marianelli et al., 2010; Santos et al., 2020) ou les porcs (Di Marco et al., 2012).

- des **animaux domestiques** comme les chiens et les chats (qui ne peuvent pas contribuer au maintien et à la transmission du pathogène) (Gay et al., 2000; O'Connor et al., 2019).

- des **animaux sauvages libres ou en captivité** comme les sangliers, les cervidés, les opossums, les blaireaux ou les renards (Gortázar et al., 2012; Lambert et al., 2017; Matos et al., 2016; Millán et al., 2008; Nugent et al., 2015; Palmer, 2013; Payne, 2014).

Tous les hôtes ne jouent pourtant pas le même rôle dans la survie et la dissémination de ce pathogène. Celui-ci va dépendre de la réceptivité, de la sensibilité et du niveau d'excrétion de l'hôte qui vont permettre de définir son rôle dans la dynamique de l'infection au sein de la communauté d'hôtes. Ce rôle est calculé avec un taux de reproduction de base ou  $R_0$ , qui se définit par le nombre moyen de cas secondaires provoqués par un sujet atteint d'une maladie transmissible au sein d'une population (ou infecté par cet agent) (Palmer, 2013; Smith, 2012; Ward et al., 2012). Trois types d'hôtes peuvent être définis :

- **l'hôte de maintien** qui est un hôte avec un  $R_0$  égal ou supérieur à 1. Cet hôte a plusieurs rôles éco-épidémiologiques. Tout d'abord, le rôle d'hôte amplificateur, car il sert d'habitat et de support pour le développement de l'agent pathogène qui a su déjouer l'immunité de son hôte. L'agent pathogène peut ensuite se développer et infecter d'autres espèces grâce aux déplacements en augmentant ainsi la zone infectée. L'hôte joue donc un rôle de spatial (permettant l'extension de l'infection dans l'espace) et de temporel (permettant l'extension de l'infection dans le temps). Cet hôte permet, seul, de faire persister l'infection au sein d'une population et est une source d'infection pour les autres espèces réceptives. (Corner, 2006; Nugent, 2011).

- **l'hôte de liaison** est un hôte ayant un  $R_0$  compris entre 0 et 1. Cet hôte n'est pas capable de maintenir seul et de façon pérenne l'infection sans une source de contamination

extérieure. Néanmoins, il permet tout de même à l'agent pathogène d'être transmis et joue donc un rôle dans la dissémination géographique (Corner, 2006; Nugent, 2011).

L'infection disparaît en absence de source de contamination extérieure. Le blaireau, le sanglier, le cerf (excepté pour la forêt de Brotonne-Mauny) et le renard sont considérés comme des hôtes de liaison en France (selon l'avis de l'ANSES du rapport d'expertise collective de 2021 « Rôle épidémiologique du renard dans la transmission de la tuberculose bovine »). Ce rôle peut être différent pour une espèce selon le pays étudié.

- **l'hôte cul-de-sac épidémiologique** est un hôte ayant un  $R_0$  de 0. Dans ce cas, ni la transmission ni le maintien ne sont assurés par cet hôte. Il est souvent un hôte « accidentel » de l'infection. La plupart des carnivores sauvages non-mustélidés mais aussi le lapin, le rat, la taupe et le hérisson sont considérés comme des hôtes de liaison ou cul-de-sac (Hars et al., 2006; Renwick et al., 2007).

Ces rôles dépendent donc de la capacité d'un hôte infecté à maintenir et transmettre l'agent pathogène. Ces caractéristiques varient selon la sensibilité pour *M. bovis*, l'écologie et l'éthologie de l'hôte (Palmer, 2013). La détection de l'infection de *M. bovis* a été réalisée chez le sanglier *Sus scrofa*, espèce très réceptive à l'infection mais dont la capacité d'excrétion et la sensibilité en général sont considérées faibles (mais peut dépendre de la région étudiée), il est donc considéré un hôte de liaison (Hars et al., 2013; Zanella et al., 2008). L'aire de déplacement des sangliers étant vaste, elle permet ainsi l'extension géographique de l'infection (Ghielmetti et al., 2021). Le cerf *Cervus elaphus* est également considéré comme un hôte de liaison (Hars et al., 2013, 2006). Il a été désigné comme un réservoir primaire de l'infection lors de la découverte du foyer important de Brotonne-Mauny, car il transmettait et maintenait l'infection de lui-même, ce qui a entraîné l'élimination complète de la population (Hars et al., 2013; Zanella et al., 2008). Il est distingué le terme de réservoir primaire de celui de réservoir secondaire par le fait qu'il transmet de lui-même le bacille aux autres espèces. Les chevreuils (*Capreolus capreolus*) sont moins souvent trouvés infectés mais peuvent également, dans une moindre mesure, être considérés comme des hôtes de liaison dans certaines circonstances, car ils peuvent présenter une grande capacité d'excrétion lorsqu'ils présentent des lésions ouvertes, ce qui peut favoriser la transmission de l'agent pathogène par contact indirect (points d'eau ou pâturages contaminés) (Lambert et al., 2017; Réveillaud et al., 2018). Le blaireau *Meles meles* est également un hôte de liaison important dans le cycle de transmission multi-hôte. Plusieurs études ont décrit l'infection à *M. bovis* du blaireau à *M. bovis* dans des nombreuses régions de France (Payne et al., 2012; Réveillaud et al., 2018). La prévalence reste néanmoins plus faible qu'en Irlande ou au Royaume-Uni, où l'infection est très présente dans les populations de

blaireaux, ce qui lui vaudrait d'être considéré un hôte de maintien (Allen et al., 2019; Olea-Popelka et al., 2005). Bien que les renards semblent avoir une contribution moindre à la circulation de *M. bovis* que le sanglier, le cerf ou le blaireau, ils pourraient néanmoins avoir un rôle dans les régions très touchées, où ils pourraient également être considérés comme un hôte de liaison (selon l'avis de l'ANSES du rapport d'expertise collective de 2021 « Rôle épidémiologique du renard dans la transmission de la tuberculose bovine »).

Le caractère multi-hôte de cet agent pathogène le rend plus compliqué à surveiller et à éradiquer par rapport à des agents pathogènes n'ayant qu'un hôte de maintien (Nugent, 2011; Santos et al., 2020). La multiplicité des espèces infectées jouant le rôle d'hôte de liaison individuellement peut aussi permettre le maintien et la transmission de *M. bovis* dans une zone partagée par ces différentes espèces. La création de réservoir est conditionnée par la densité et l'interaction des différents hôtes (Caron et al., 2015; Haydon et al., 2002; Viana et al., 2014). En effet, il a été montré en France dans les zones enzootiques, qu'il existe des communautés d'hôtes regroupant plusieurs espèces différentes (Réveillaud et al., 2018). Celles-ci, par contact majoritairement indirect avec les bovins, permettraient un relai d'infection par la faune sauvage (Corner, 2006; Drewe et al., 2013; Payne, 2014).

La surveillance de la maladie et de l'infection dans la faune sauvage est donc importante à prendre en compte et sera détaillée dans la partie 1.3.3.2. **La tuberculose dans la faune sauvage en France et le réseau Sylvatub.**

La surveillance des animaux sauvages pourrait être différente selon les pays, à cause de la diversité des espèces affectées. Indépendamment de la région, elle est toujours difficile à mettre en place du fait de la difficulté de capture, du coût des mesures mises en place et des différentes techniques de diagnostic et/ou dépistage utilisées (Gortazar et al., 2011; Hars et al., 2013; Jamin and Rivière, 2020; Réveillaud et al., 2018; Ryser-Degiorgis, 2013; Thomas et al., 2021). Un moyen de contrôle de la maladie et de l'infection dans les populations sauvages –et en retour chez les bovins– est la réduction des effectifs des espèces affectées, comme cela a été pratiqué en forêt de Brotonne pour les cervidés et les sangliers (Réveillaud et al., 2018), ou encore en Grande-Bretagne dans certaines zones pour le blaireau (Langton et al., 2022). La vaccination par voie orale de la faune sauvage est une option de gestion plus éthique pour réduire la propagation de l'infection et de la maladie. En effet, l'administration du vaccin BCG ou de souches de *M. bovis* inactivée chez le blaireau (*Meles meles*) ou le sanglier (*Sus scrofa*) a montré des résultats prometteurs dans le contrôle de la maladie avec une réduction des lésions tuberculeuses, mais également une baisse de la probabilité pour l'animal de développer la

maladie ou d'excréter le bacille viable (Ballesteros et al., 2009; Chambers et al., 2011; Garrido et al., 2011; Gormley et al., 2022; Gormley and Corner, 2013, 2017; Lesellier et al., 2020).

Depuis l'autorisation par la législation britannique du vaccin BadgerBCG© en 2010, les campagnes de vaccination locales de certaines régions du Royaume-Uni ont permis l'administration de plus de 10 000 doses (Benton et al., 2020).

#### **1.1.4.2. Un agent pathogène zoonotique**

*M. bovis* est un agent zoonotique qui peut se transmettre de l'animal aux humains dans certaines conditions (Etchehoury et al., 2010). L'incidence de la TB zoonotique est en moyenne de 140 000 nouveaux cas par an (entre 69 800 et 235 000) (Kock et al., 2021; World Health Organization, 2020). L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA, ancienne OIE), considère également que la tuberculose animale représente 1,4% des nouveaux cas humains de TB. Cette incidence est néanmoins beaucoup moins importante dans les pays développés qui ont mis en place diverses mesures pour lutter contre la bTB (voir partie 1.3.1. **La tuberculose bovine dans le monde**).

La transmission de *M. bovis* des animaux aux humains peut se faire lors d'exposition directe à un animal infecté ou en consommant des produits venant d'animaux infectés. Les humains infectés par *M. bovis* peuvent néanmoins être considérés plutôt comme un hôte cul-de-sac, car la transmission entre humains et la transmission à l'animal sont rares (Pérez-Lago et al., 2014; Sunder et al., 2009).

La véritable incidence de la tuberculose zoonotique reste incertaine en raison de l'absence de données de surveillance de routine dans de nombreux pays et la non-réalisation de diagnostic espèce dans les pays en développement. De plus, la prévalence de *M. bovis* chez les humains est un indicateur inadéquat pour se rendre compte de l'impact total de la tuberculose zoonotique (Duffy et al., 2020). En effet, comme il a été présenté précédemment, d'autres membres de la branche animale du MTBC peuvent également provoquer une tuberculose chez les humains.

Par conséquent, le nombre de personnes contractant une tuberculose zoonotique chaque année et souffrant des problèmes de santé causés par l'infection à *M. bovis* pourrait être plus élevé que ce qui est actuellement estimé (Harris and Reza, 2012; Olea-Popelka et al., 2017; Von Philipsborn et al., 2015). De plus, la tuberculose zoonotique chez les humains est souvent associée à une tuberculose extra-pulmonaire qui peut être mal ou non diagnostiquée, et donc retarder l'initiation du traitement (Dürr et al., 2013; Sunnetcioglu et al., 2015). Comme mentionné précédemment, les caractéristiques intrinsèques de *M. bovis* présentent des défis particuliers pour le traitement et le rétablissement des patients. Par ailleurs, elle est

naturellement résistante au pyrazinamide, l'un des quatre médicaments utilisés dans le schéma thérapeutique standard de traitement antituberculeux de première intention.

Pour enrayer la tuberculose humaine, il est donc essentiel également de lutter contre sa forme zoonotique. Une Feuille de Route a été établie en 2017 par l'OMSA (anciennement OIE), l'OMS et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) pour définir les grands axes de lutte contre la tuberculose zoonotique.

Ce plan repose sur le concept « Une Seule Santé » qui se base sur un principe simple, selon lequel la protection de la santé humaine passe par celle de l'animal et/ou de la lutte contre l'infection animale, ainsi que de leurs interactions avec l'environnement (*Roadmap for zoonotic tuberculosis* OIE 2017). La feuille de route a été rédigée à la suite d'une stratégie mise en place par l'OMS en 2014 ayant pour but de mettre fin à la tuberculose humaine, dont la tuberculose zoonotique, d'ici 2030. Elle contient 3 thèmes principaux qui sont d'améliorer les connaissances scientifiques, de réduire la transmission à l'interface animal-homme et de renforcer des démarches intersectorielles et collaboratives.

#### **1.1.4.3. La persistance de *M. bovis* dans l'environnement**

En plus d'être résistante au froid et à la congélation (Borham et al., 2022), *M. bovis* présente également une persistance environnementale de plusieurs semaines à plusieurs mois, que ce soit en condition d'été ou d'hiver, sur différentes matrices comme le sol (Barbier et al., 2017; Fine et al., 2011; Ramzi et al., 2014), l'eau (Fine et al., 2011), certains aliments comme le maïs (Fine et al., 2011; Palmer and Whipple, 2006), les fèces (King et al., 2015; Tanner and Michel, 1999) ou le lisier (O'Hagan et al., 2016; Scanlon and Quinn, 2000) et le foin (Fine et al., 2011; Palmer and Whipple, 2006).

Cette résistance et cette persistance dans différents environnements rendent l'éradication de la tuberculose animale plus compliquée et constituent un facteur de risque épidémiologique supplémentaire (Allen et al., 2021). En effet, le fait que *M. bovis* puisse survivre pendant de longues périodes dans le sol (Ramzi et al., 2014), a conduit les chercheurs à postuler que la transmission indirecte par contamination environnementale peut faciliter la persistance et la propagation de la tuberculose bovine (Allen et al., 2018; Brooks-Pollock et al., 2014; Ward et al., 2010). Néanmoins, la façon dont *M. bovis* arrive à persister dans différents milieux hostiles n'est pas connue.

##### **1.1.4.3.1. L'interaction avec la faune du sol**

Les mycobactéries sont également capables d'interagir avec la faune du sol. *M. bovis*, comme d'autres mycobactéries pathogènes, peut interagir avec les amibes (Butler et al., 2020; Mba

Medie et al., 2011; Sanchez-Hidalgo et al., 2017). Sa survie pendant plusieurs mois après l'infection dans plusieurs espèces d'amibes telles que *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba lenticulata*, *Vermamoeba vermiformis* et *Dictyostellium discoideum* sous différentes formes (trophozoïtes et kystes) a été démontrée en conditions expérimentales (Mardare et al., 2013; Sanchez-Hidalgo et al., 2017; Taylor et al., 2003). Un « entraînement » du MTBC à l'échappement au macrophage de l'hôte lors de l'infection a été suggéré par certaines études (Butler et al., 2020).

Le lombric pourrait également être un acteur de la dissémination de *M. bovis*. Après avoir ingéré de la matière fécale fraîche contenant la bactérie, il est capable de le disséminer dans le sol par le biais des turricules qu'il laisse à la surface lorsqu'il creuse ces tunnels (Barbier et al., 2016). *M. bovis* peut rester jusqu'à 4 jours dans le système digestif du lombric avant d'être excrété dans le sol ce qui lui permet de se protéger des UV et de la déshydratation, et donc favorise sa persistance dans l'environnement.

Étant capable d'infecter les humains, les animaux et persister dans l'environnement, *M. bovis* est un parfait exemple pour illustrer le concept « d'une seule santé ». Il est donc important de prendre en compte ces trois composantes pour mieux comprendre les liens de transmission de cet agent pathogène et pouvoir le combattre de manière plus efficace.

### **1.1.5. L'infection par *M. bovis*, la tuberculose animale et ses facteurs de risque**

#### **1.1.5.1. Les étapes de l'infection de *M. bovis* chez les bovins**

Lors de l'infection d'un hôte, les bacilles qui ont pénétré dans l'organisme sont rapidement phagocytés par les macrophages lors de l'activation de la réponse non spécifique du système immunitaire. Bien qu'une partie des bacilles soient détruits lors de cette étape, une autre partie peut réussir à survivre dans les macrophages ils sont alors appelés bacilles quiescents et s'y multiplier, généralement sans signe clinique (Delannoy et al., 2020; Pollock and Neill, 2002; Thorel, 2003). La généralisation de la TB correspond à la phase où la réponse immunitaire est inefficace et les bacilles se disséminent dans l'hôte. Ils peuvent le faire par voie bronchique, donnant une tuberculose pulmonaire ou par la voie lympho-hématogène, donnant une tuberculose aigüe (Borham et al., 2022; Buddle et al., 2018; Thorel, 2003). Dans la plupart des cas de stabilisation, il y a cicatrisation des lésions qui peuvent se calcifier avec présence de remaniements fibreux ou de nodules persistants appelés tuberculomes (Baunin et al., 2013).

Il est important de mentionner que ces étapes d'infection chez les bovins ne sont pas totalement extrapolables à toutes les espèces animales sensibles à l'infection à *M. bovis*.



### **1.1.5.2. Les voies de transmission de *Mycobacterium bovis***

Chez les bovins, la plus importante voie d'infection serait la projection et dispersion de gouttelettes dans l'atmosphère d'un animal infecté (Fennelly et al., 2004; Loudon and Roberts, 1967). Les fèces et l'urine peuvent aussi être des sources de contamination si la localisation de la TB est digestive ou rénale (Goodchild and Clifton-Hadley, 2001; Humblet et al., 2009; Pollock and Neill, 2002). Le lait peut également être une source de contamination. Parmi les voies d'excrétion, les sécrétions lors d'infection génitale sont retrouvées (Francis, 1958). Le risque d'excrétion dépend de la nature des lésions. En effet, les formes dites ouvertes de tuberculose (poumon, intestin, utérus, mamelle, etc) sont considérées plus dangereuses (Fischer et al., 2005). Néanmoins, les animaux sans lésion peuvent quand même excréter des quantités faibles de bacille, suffisantes pour infecter d'autres animaux. Cette infection peut se faire avec quelques bacilles (1 seul bacille viable est suffisant pour provoquer la bTB) par inhalation d'un aérosol contenant l'agent pathogène ou avec une dose plus forte en bacilles par ingestion d'aliment contaminé ( $4 \times 10^8$  bacilles) (Dean et al., 2005; Johnson et al., 2007).

### **1.1.5.3. Les facteurs de risque**

Le risque qu'un animal ait la bTB et contamine les autres membres du cheptel dépend de plusieurs facteurs individuels, liés au cheptel et à l'environnement.

#### **D 'introduction**

L'un des facteurs individuels qui peut jouer sur la probabilité de l'introduction de la maladie chez un animal est son âge (Cleaveland et al., 2007; Dejene et al., 2016; Delafosse et al., 2002; Hamed et al., 2021). En effet, un animal qui vit plus longtemps a plus de risques d'être exposé et d'être mis en contact avec *M. bovis*. L'âge inclut un déclin de la résistance à l'infection qui peut aussi expliquer qu'il soit un facteur de risque (O'Reilly and Daborn, 1995).

La compétence immunitaire peut également varier selon de nombreux critères comme la présence de co-infections, une mauvaise alimentation ou l'état physiologique de l'animal (Skuce et al., 2011; van Crevel et al., 2002)). La race du bovin joue également un rôle sur le risque individuel et sur la sensibilité de l'animal aux maladies (le Roex et al., 2013). En effet, l'expression de gènes entre certaines races bovines peut être différente et jouer un rôle dans la réponse à l'infection à *M. bovis* (Brotherstone et al., 2010; Humblet et al., 2009; Skuce et al., 2011). Il a été montré une résistance plus élevée à la bTB chez *Bos taurus indicus* par rapport à *Bos taurus taurus* (Ameni and Erkihun, 2007; Carmichael, 1941). Cet aspect est encore mal compris, mais plusieurs études notamment de GWAS (*genome-wide association study* en anglais ou étude d'associations pan-génomiques) ont été et sont réalisées pour connaître les

gènes impliqués dans la résistance à la maladie et leur mode d'action. Il pourrait ensuite être possible de sélectionner des espèces plus résistantes à l'infection de *M. bovis*, même si il est toujours dangereux d'envisager une sélection sur de tels critères (Banos et al., 2017; Bermingham et al., 2014; Ruiz et al., 2019; Uren et al., 2017). Néanmoins il se pourrait que les différences observées entre les races puissent être expliquées par des utilisations et gestions des cheptels différents.

Indépendamment de la race, certains traits de sensibilité et/ou résistance ont été trouvés chez les bovins (Skuce et al., 2011). Ils constitueraient une caractéristique importante pour la transmission de *M. bovis* et des données récentes suggèrent qu'elle pourrait jusqu'à un certain point être sous contrôle de traits génétiques qui restent encore à explorer. Des études de simulation suggèrent que la sélection génétique d'animaux pour la résistance à la maladie peut compléter et améliorer considérablement les approches actuelles de contrôle de la maladie en vue de l'éradication de la tuberculose bovine (Tsairidou et al., 2018).

Le type de cheptel est un facteur de risque important dans le développement de la bTB. Les bovins laitiers subissent d'importants changements hormonaux et des stress qui peuvent provoquer un passage d'une tuberculose infection à une tuberculose clinique (Barlow et al., 1997; Broughan et al., 2016). Ces facteurs de risque peuvent expliquer la différence de prévalence entre les bovins femelles et mâles qui a été rapportée dans plusieurs études (Bonsu et al., 2000; Brooks-Pollock et al., 2013; Broughan et al., 2016; Inangolet et al., 2008).

### **Voisinage et propagation**

La taille et la densité de l'élevage augmentent aussi le risque d'introduction de la maladie chez un animal mais aussi de la propagation dans le cheptel. En effet, d'un point de vue biologique, la probabilité d'infection d'un cheptel augmente en fonction de sa taille, car plus le nombre d'animaux à risque est élevé, plus la probabilité que l'un d'entre eux contracte l'infection est grande. Les grands troupeaux pâturent généralement sur une plus grande surface, avec une probabilité plus élevée d'avoir des troupeaux plus contigus, ce qui augmente le risque de propagation d'un animal à l'autre ou d'un troupeau à l'autre. Plus le nombre d'animaux soumis aux tests cutanés est important, plus la probabilité d'avoir un animal réagissant est élevée. Néanmoins, un nombre de tests plus important peut augmenter le risque d'avoir des tests faussement positifs, car leur spécificité est imparfaite. Des facteurs de risque liés à la gestion, tel que le taux de renouvellement du troupeau, la densité de peuplement, l'entreprise agricole et les aliments (pouvant être contaminé par exemple) peuvent également trouver un lien avec la taille du cheptel (Griffin et al., 1996; Humblet et al., 2010; Porphyre et al., 2008).

Le défaut de sensibilité des tests de dépistage peut favoriser une propagation plus ou moins rapide de l'infection au reste du troupeau si un des animaux est infecté. Le déplacement du troupeau (transhumance) ou l'introduction de nouveaux bovins dans un cheptel sont aussi des facteurs de risque majeurs surtout si les animaux proviennent d'une zone où la bTB est très prévalente et/ou s'il y a eu un défaut de dépistage lors de l'introduction de l'animal (Avila et al., 2018; Marsot et al., 2016; Palisson et al., 2016; Ribeiro-Lima et al., 2015). Il est donc important que ces événements soient contrôlés et encadrés (voir partie 1.3.3.1. **Mise en place des mesures pour l'éradication de la tuberculose bovine en France**).

L'hygiène et l'entretien des élevages influencent également le risque d'infection du cheptel. Des locaux mal entretenus, humides, mal ventilés ou avec une promiscuité trop élevée entre les bovins sont des facteurs de risque de propagation de la bTB (Skuce et al., 2011). Il n'est par contre pas établi si le mauvais état corporel d'un animal infecté est le résultat ou la cause d'une infection à *M. bovis* (Humblet et al., 2009). Le prêt de matériel entre éleveurs peut également être un facteur de risque supplémentaire de propagation de la maladie. La présence d'autre élevage à proximité du cheptel est également un facteur de risque supplémentaire, car il peut favoriser les contacts entre les bovins des différentes pâtures ou la contamination par contact indirect (Griffin et al., 1993).

### **Résurgence**

Le climat, la présence d'eau ou de forêt peut permettre la persistance de *M bovis* dans l'environnement ou dans la faune sauvage ce qui représente un risque d'infection ou de ré-infection de cheptel ainsi qu'un risque de propagation de la maladie aux autres cheptels à proximité (Biek et al., 2012; Ribeiro-Lima et al., 2015).

## **1.2. Les méthodes de détection de la tuberculose.**

Du dépistage de la maladie au typage précis de la souche responsable de l'infection, il existe de nombreux outils aux rôles différents et complémentaires pour lutter le plus efficacement possible contre la bTB.

Plusieurs tests ont été développés au cours du temps pour dépister la bTB. Deux tests de dépistage basés sur la détection de la réaction d'hyper sensibilité retardée (HSR) ont été reconnus par l'OIE depuis 1964 en accord avec la directive de la législation européenne 64/432/CEE et la loi européenne sur la santé animale (LSA) (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) et al., 2017). Ces tests sont l'intradermo-tuberculation simple (IDS) et l'intradermo-tuberculation comparative (IDC) qui sont développées plus tard dans cette partie

(More et al., 2017). La loi autorise également aux États membres l'utilisation du test de dosage de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ). Ce test est utilisé par la France en accord avec l'avis de l'ANSES 2017-SA-0121 (datant de décembre 2019) et selon les conditions fixées par un arrêté ministériel (arrêté du Ministre chargé de l'agriculture du 19 octobre 1999). Une réponse non négative à un de ces tests de dépistage, d'un test de dosage de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) ou à un test sérologique, permet de suspecter l'animal d'être infecté de TB et va entraîner un abattage diagnostique ou un contrôle par test de dosage de IFN $\gamma$  de l'animal suspect ainsi que le placement sous arrêté préfectoral du cheptel de la mise sous surveillance (arrêté du 8 octobre 2021). Dans le cas d'une confirmation de l'infection de l'animal, la qualification « indemne d'infection par le complexe *Mycobacterium tuberculosis* » est retirée au cheptel et il est déclaré infecté.

Les méthodes de diagnostic pratiquées en France pour mettre en évidence l'infection selon l'arrêté du 8 octobre 2021 sont : la recherche bactériologique de *M. bovis*, *M. tuberculosis* ou *M. caprae* sur milieu spécifique et la PCR (« *Polymérase Chain Reaction* » en anglais, réaction en chaîne par polymérase). Celles-ci sont réalisées par des laboratoires agréés pour la recherche de mycobactéries par les techniques citées.

### **1.2.1. Diagnostic ante mortem**

#### **1.2.1.1. Les tests tuberculiques**

Les tests *ante mortem* sont des tests efficaces pour le dépistage de l'infection. Lors de l'infection d'un bovin et de la pénétration de *M. bovis* dans les macrophages et autres cellules du système phagocytaire mononucléaire une réaction immunitaire cellulaire va se mettre en place impliquant en particulier les macrophages et lymphocytes T (Figure 7) (de la Rua-Domenech et al., 2006; Pollock and Neill, 2002). Le dépistage de la bTB peut donc être réalisé avec des tests tuberculiques ou épreuves d'intradermotuberculination (IDT) qui vont révéler HSR *in vivo* à la suite d'injection intradermique de tuberculine (protéines purifiées extraites du surnageant de culture de mycobactéries) (de la Rua-Domenech et al., 2006; Francis, 1958).

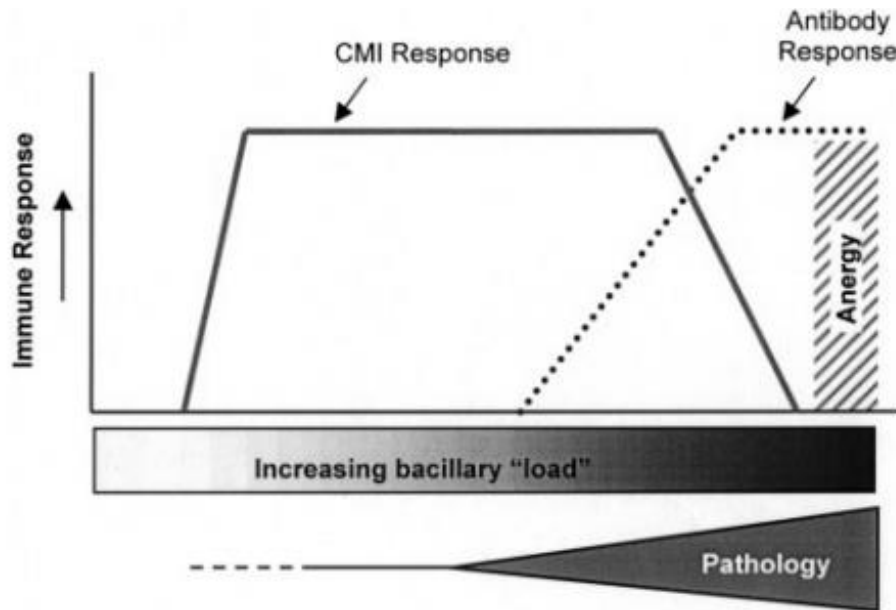


Figure 7 : Représentation graphique de la réponse immunitaire chez le bovin après une infection par *Mycobacterium bovis* et au cours de l'augmentation de la charge bactérienne. La réponse immunitaire à médiation cellulaire (CMI) se développe au début de l'infection. En cas d'évolution clinique défavorable, elle est ensuite progressivement remplacée par une réponse immunitaire humorale et une production d'anticorps spécifiques à l'infection. Dans certains cas, le système immunitaire peut s'épuiser et donner lieu à une période d'anergie (Pollock and Neill, 2002).

Lors de test IDS, une dose de tuberculine bovine composée de 0,1 mL de dérivé protéinique purifié bovin (PPD-B) titré à 20 000 UCT/mL est injectée dans l'épaisseur du derme (obligation d'injection dans l'encolure en France) ou du pli sous-caudal (interdite en Europe) de l'animal (Figure 8). Un point d'injection supplémentaire de dérivé protéinique purifiée aviaire (PPD-A) est réalisé lors de tests IDC. Les deux points d'injection à 4 heures d'intervalles (PPD-B et PPD-A) sont alors séparés de 12 à 15 cm. La réaction est ensuite appréciée après 72h au point d'inoculation (Delafosse et al., 2002; Monaghan et al., 1994) et implique la mesure de l'épaississement du pli cutané à l'aide d'un cutimètre.

Pour l'IDC, une comparaison entre l'épaississement aux deux points d'injection est réalisée pour augmenter la spécificité du test vis-à-vis des membres du MTBC par rapport aux autres mycobactéries dites « atypiques » (par exemple les membres du complexe MAC). La lecture est généralement accompagnée d'une lecture qualitative visuelle ou par palpation (Figure 8).



Figure 8 : Réalisation (photo de gauche) de l'injection de la tuberculine puis (photo de droite) de la mesure du pli de la peau (Philizot and Bénét, 2011).

Les avantages de l'IDS sont qu'elle est facile à utiliser et inoffensive pour l'animal (Schiller et al., 2010). La spécificité de ce test varie de 91% à 98,2% selon l'avis de l'ANSES (Dépistage de la tuberculose bovine par le test interféron Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective). La sensibilité de ce test est assez faible et peut varier fortement selon l'expérimentateur de 76% à 94% selon l'avis de l'ANSES. Il faut donc être vigilant aux lectures trop précoces (bien que la réglementation impose 72h, et plus ou moins 4h avec l'IDC, entre l'injection et la lecture) (Lauzi et al., 2000) (Chenal 1994), au site d'injection (de la Rua-Domenech et al., 2006; Monaghan et al., 1994) ainsi que de s'assurer de l'absence de grosseur ou de lésion au site d'injection (Thorel 2003). Ce test induit de nombreux cas de résultats faussement positifs dû à des réactions avec d'autres mycobactéries du complexe MAC comme *Mycobacterium avium* (Lauzi et al., 2000; Roupie et al., 2018; Seva et al., 2014). Un autre point négatif et qu'il faut attendre 6 semaines entre deux IDT, car il y a l'induction d'une redirection de la capacité de l'organisme à répondre à un nouveau test.

L'IDC est plus discriminante que l'IDS avec une meilleure spécificité avec des valeurs médiane pouvant atteindre 100%, mais est plus difficile à réaliser et plus coûteuse (Dépistage de la tuberculose bovine par le test interféron Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective). La sensibilité de ce test est plus faible que celle de l'IDS et peut varier entre 40% à 80% selon l'avis de l'ANSES. Avant 2017, l'utilisation de l'IDS restait majoritaire devant l'IDC, avec 57.9% des tests d'intradermo tuberculination (IDT) réalisées sur les troupeaux (Delavenne et al., 2020). La préférence de l'utilisation des IDT s'est depuis inversée avec l'application de l'instruction 2017-979, note de service de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL/SDSPA/2017-979) qui a rendu l'utilisation de l'IDC quasiment systématique afin d'améliorer la qualité de surveillance en éliminant les faux tests positifs dus aux mycobactéries atypiques (Delavenne et al., 2020).

### **1.2.1.2. Le test de dosage d'interféron gamma**

Le test a été développé dans les années 1980 en Australie. Il est basé sur le dosage d'IFN $\gamma$  qui est une lymphokine produite par les lymphocytes thymodépendants (principalement de type CD4+, mais aussi de type CD8+ et  $\gamma\delta$ TCR+) circulants qui ont été stimulés par des antigènes mycobactériens (Figure 7) (Pollock et al., 2001; Rhodes et al., 2000; Tascon et al., 1998; Toka et al., 2004). L'IFN $\gamma$  peut également être produit dans certains cas par les cellules « tueuses naturelles » (NK) (Olsen et al., 2005; Tascon et al., 1998; Toka et al., 2004). Après stimulation d'un échantillon de sang d'un animal par différents antigènes, il est donc possible de doser l'IFN $\gamma$  afin de déterminer si les lymphocytes ont été en contact avec l'agent pathogène et donc si l'animal a été infecté (Pollock and Neill, 2002; Rothel et al., 1990; Wood et al., 1990). Le test de dosage d'IFN $\gamma$  est utilisé en série pour le dépistage ou en parallèle d'IDT pour l'assainissement en l'utilisant comme un test de confirmation de réaction positive et négative. Les avantages de cette technique, par rapport au IDT, sont qu'elle permet une détection précoce de l'infection (1 à 5 semaines contre 3 à 6 pour les IDT) (Buddle et al., 1995; Coad et al., 2008; de la Rua-Domenech et al., 2006; Neill et al., 1994; Wood and Jones, 2001) et permet de détecter une importante proportion d'animaux infectés (de la Rua-Domenech et al., 2006; Neill et al., 1994; Pollock et al., 2001). Un autre avantage de cette technique par rapport au IDT est que la sensibilisation des lymphocytes se fait en laboratoire sur un prélèvement de sang et pas sur l'animal directement comme dans le cas de l'IDT. La sensibilité du test IFN $\gamma$  PPD varie de 73,6% à 87,6% et à une spécificité de valeur médiane de 87,1% à 97% (Dépistage de la tuberculose bovine par le test interféron Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective). Néanmoins, l'utilisation d'autres immunogènes spécifiques au MTBC comme CFP10 (« *10kDa Culture Filtrate Protein* » en anglais, protéine du filtrat de culture de 10kDa) ou ESAT-6 (« *Early Secreted Antigenic Target 6 kDa* » en anglais, cible antigénique sécrétée précoce de 6 kDa) peut augmenter la spécificité du test et propose une sensibilité similaire au test IFN $\gamma$  PPD (Buddle et al., 2001; de la Rua-Domenech et al., 2006; Gormley et al., 2006; Pollock et al., 2000; van Pinxteren et al., 2000). Il est toutefois compliqué de généraliser les données du test IFN $\gamma$  car les seuils de positivité ne sont pas harmonisés entre les pays et que la majorité des études utilisent les antigènes PPD-A et PPD-B ou les antigènes recombinés CFP10 et ESAT-6, mais jamais en combinaison.

Dans certains cas, la bTB peut évoluer en phase anergique au cours de laquelle l'HSR ne peut plus être détectée. Lors de cette phase, les IDT et l'IFN $\gamma$  ne peuvent donc plus être utilisés.

## **1.2.2. Diagnostic post mortem**

### **1.2.2.1. Présence de lésions à l'abattoir**

La découverte de ces lésions évocatrices de l'infection à la bTB à l'abattoir est généralement un bon indicateur et permet de suspecter l'animal comme étant infecté. Cette découverte doit être complétée par d'autres tests diagnostiques pour prouver que ce sont bien des lésions tuberculeuses spécifiques à un agent de la TB règlementée recherché (*M tuberculosis*, *M. caprae* et *M. bovis*). Cette détection conduit à une saisie complète ou partielle des carcasses selon le stade d'évolution de la maladie. En Europe, la saisie est partielle si la lésion ne présente pas de potentiel fort de dissémination et si la lésion n'est pas généralisée et limitée à un seul organe (note de service de la DGAL DGAL/SDSPA/SDSSA/N2013-8123 du 13 juillet 2013). La proportion de foyers de bTB découverts à l'abattoir peut être révélatrice de l'efficacité de la surveillance et du dépistage mis en place. Cette proportion est passée de 70% à 80% au début des années 2000 contre 28% en 2017, ce qui montre les progrès de la France dans le dépistage de la bTB (Delavenne et al., 2020).

### **1.2.2.2. L'analyse histologique**

Le résultat seul de l'histologie ne permet pas d'affirmer que l'animal est infecté de TB, mais permet de suspecter l'animal comme l'étant et doit être complété d'une analyse bactériologique ou d'un test PCR. Cette technique a une bonne sensibilité (93,6% [89,9–96,9 %]) mais manque de spécificité (83,3% [78,7–87,6 %]) ce qui explique qu'elle doit toujours être confirmée par une autre méthode (Courcoul et al., 2014; Watrelot et al., 2006). L'histologie est une technique dont le résultat peut être obtenu en moins de 8 jours. Cette analyse permet de présumer une mycobactériose en observant les lésions et cellules immunitaires (granulome, nécrose et cellules géantes de Langhans) avec la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (Larenas-Muñoz et al., 2022; Varello et al., 2008). Elle permet également d'observer la présence de BAAR en utilisant une coloration au Ziehl-Neelsen. Les bacilles apparaissent alors en rose à partir de matériel tissulaire, de crachat ou de bacille isolé en laboratoire (Figure 2) (Deun et al., 2008). D'autres colorations peuvent être utilisées comme la coloration à l'auramine O qui donne une coloration des bacilles en vert-jaune, mais doit être confirmée par une coloration au Ziehl-Neelsen (Costa et al., 2013).

### **1.2.2.3. L'analyse bactériologique**

La réalisation de la bactériologie est longue ce qui constitue un inconvénient majeur de cette méthode avec un délai de plusieurs mois (environ 3 mois à 37°C) nécessaire pour rendre un résultat négatif, et un délai de 10 à 14 semaines pour la culture et le typage d'un échantillon



positif à *M. bovis*, *M. caprae* or *M. tuberculosis*. En France, les prélèvements sont décontaminés pour inactiver les bactéries contaminantes de l'échantillon et éviter qu'une bactérie à croissance rapide puisse épuiser les nutriments du milieu de culture et empêcher la croissance de *M. bovis* (Ambrosio et al., 2008; Medeiros et al., 2012). Cette méthode est appliquée selon la norme AFNOR NF U47-104 en utilisant de l'acide sulfurique pour permettre la sélection des BAAR dont la population est également réduite lors de cette étape (Thorel, 1982, 1976). Les prélèvements sont ensuite classiquement ensemencés sur des milieux sélectifs solides tels que Coletsos, Middlebrook 7H10 ou 7H11 avec de l'OADC (contenant de l'acide oléique, de l'albumine bovine, du dextrose et de la catalase), et Lowenstein-Jensen (avec l'addition de vert de malachite qui permet de ne pas sélectionner les mycobactéries à croissance rapide) qui est le milieu de référence pour la culture des mycobactéries. Ces dernières peuvent également être cultivées en milieux liquides en utilisant le milieu Middlebrook 7H9 avec de l'ADC (contenant de l'albumine bovine, du dextrose et de la catalase), ou en tube MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator*).

Les souches isolées dans le réseau national de laboratoires agréés pour le diagnostic de la TB sont centralisées au Laboratoire National de Référence (LNR). La sensibilité et spécificité varient selon le protocole bactériologique utilisé comprenant non seulement le milieu de culture mais également la méthode de décontamination utilisée (Ambrosio et al., 2008; T. R. Crawshaw et al., 2008; Medeiros et al., 2012). En effet, ces aspects peuvent impacter le nombre de colonies obtenues ou la rapidité de croissance de la mycobactérie (de Azevedo Issa et al., 2017). Des études utilisant différentes combinaisons de milieux de culture solides ont estimé cette sensibilité entre 58.8% et 85.5% (Cavirani et al., 1999; Drewe et al., 2009).

En France, la sensibilité de la culture bactérienne sur un milieu solide de Lowenstein-Jensen a été estimée à une valeur médiane 78,1% [72,9–82,8 %] et celle de la spécificité à 99,1% [97,1–100,0 %] (Courcoul et al., 2014). L'isolement et l'identification de *M. tuberculosis*, *M. caprae* ou *M. bovis* permettent d'identifier un animal comme infecté de TB.

La caractérisation du bacille impliqué dans l'infection peut être réalisée à l'aide de méthodes moléculaires comme la PCR (qui est toujours utilisée en France pour compléter la bactériologie) ou le spoligotypage qui vont être décrites dans les prochaines parties.

#### **1.2.2.4. L'analyse par PCR**

La PCR peut être réalisée sur l'ADN extrait de tissus infectés sur les mêmes prélèvements utilisés pour la bactériologie. L'identification de l'ADN d'un des agents recherchés par PCR dans les tissus collectés post-mortem en première intention permet d'obtenir rapidement (48

heures) un résultat pour un nombre important de ces suspects par rapport à la culture bactérienne, ce qui permet de réduire les périodes de blocage des cheptels suspects mais qui sont indemnes (Schiller et al., 2010).

Lorsque l'ADN de *M. tuberculosis*, *M. caprae* ou *M. bovis* est identifié ou qu'une analyse PCR est retrouvée positive pour un des agents par le LNR, le bovin est considéré infecté de TB (arrêté du 8 octobre 2021). La PCR s'avère également très utile et efficace lorsque les prélèvements sont contaminés par la flore de l'environnement et qu'ils sont inutilisables pour la culture.

Plusieurs cibles génétiques peuvent être utilisées pour identifier les membres du MTBC ou plus spécifiquement *M. tuberculosis*, *M. caprae* ou *M. bovis*. Celles utilisées dans la stratégie de diagnostic moléculaire du LNR sont présentées dans le

Tableau 1. Par exemple, il peut être recherché la séquence d'insertion IS6110, qui est exclusive aux MTBC et dont l'utilisation est recommandée par le laboratoire de référence européen de la bTB pour la détection des MTBC, peut être recherchés. D'autres séquences spécifiques sont utilisées en seconde intention pour identifier l'espèce comme RD4 ou RD7 qui permettent de différencier *M. bovis* et *M. caprae* des autres MTBC.

La sensibilité de la PCR varie significativement et dépend de la séquence ciblée et du matériel utilisé (Schiller et al., 2010). La sensibilité de PCR est estimée en France à une valeur médiane de 87,7% et de 97% pour la spécificité (Courcoul et al., 2014).

Tableau 1 : Résultat PCR obtenus pour différents membres du MTBC avec différentes cibles génétiques. Le + indique la présence d'amplification de l'ADN d'une espèce pour une cible donnée. Le – indique l'absence d'amplification (Barbier et al., 2016; Halse et al., 2011; Hénault et al., 2006; Michelet et al., 2018c).

Espèce	IS6110	IS1561	IS1081	RD4	RD7
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	-
<i>Mycobacterium bovis</i>	+	+	+	-	+
<i>Mycobacterium microti</i>	+	-	+	+	+
<i>Mycobacterium caprae</i>	+	+	+	+	-

### **1.2.3. Génotypage des souches de *M. bovis***

#### **1.2.3.1. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction basé sur la séquence d'insertion 6110 (RFLP IS6110)**

Dans la lutte contre la TB, les outils de génotypage ont une place très importante pour identifier des souches d'une même espèce du MTBC, étudier leur diversité et suivre leurs liens de transmission. Plusieurs méthodes de génotypage ont été développées au cours du temps.

Les premières études d'épidémiologie moléculaire pour les membres du MTBC, et notamment *M. tuberculosis*, ont commencé par l'étude de séquences répétées du génome mycobactérien avec le RFLP IS6110 (« *Restriction Fragment Length Polymorphism Insertion Sequence 6110* » en anglais, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction basé sur la séquence d'insertion 6110) (Allix et al., 2006; Soolingen et al., 1991). L'IS6110 est une séquence d'insertion de 1 355 paires de base (pb) qui appartient à la famille des IS3 (Thierry et al., 1990). Elle est composée des cadres de lecture ouverts ORFA (open reading frame A en anglais, cadre de lecture A) de 327 pb et ORFB de 987 pb qui ont une partie chevauchante de leur séquence de 52 pb qui crée un troisième cadre de lecture ouvert nommé ORFAB dont le produit est une transposase (Mendiola et al., 1992; Sekine et al., 1997; Thabet and Souissi, 2017). Les séquences d'insertion ont la capacité de transposer et de s'insérer à différents endroits du génome. Cette transposition ainsi que des événements de recombinaison entre deux IS6110 peuvent induire des modifications dans le génome, notamment chez *M. tuberculosis* (Gonzalo-Asensio et al., 2018; Refrégier et al., 2019; Shitikov et al., 2019). Le nombre de copies et les sites d'insertion des IS6110 varient entre les souches au fil des différents événements génétiques (insertions, délétions...), ce qui permet un groupement des membres du MTBC. Il a été montré que *M. tuberculosis* peut présenter jusqu'à 25 copies d'IS6110 alors que *M. bovis* en possède dans la plupart des cas, une ou très peu de copies (Gonzalo-Asensio et al., 2018). L'une des copies est presque systématiquement toujours retrouvée dans la région CRISPR (« *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* » en anglais, répétitions palindromiques courtes) du génome des MTBC (Hermans et al., 1990; Refrégier et al., 2019; Thorne et al., 2011).

D'autres cibles ont été utilisées avec le RFLP pour identifier les souches de MTBC comme les PGRS (c'est une séquence répétée polymorphique qui est riche en guanine et cytosine) qui sont des séquences répétées riches en guanine et cytosine dans le génome des MTBC (Ross et al., 1992). Cette séquence a servi de sonde pour identifier la présence de 30 copies de PGRS dans les génomes de MTBC. En raison de la faible applicabilité du RFLP-IS6110 pour les souches de *M. bovis* due à leur faible nombre de copies, le RFLP-PGRS a permis une amélioration significative de la différenciation des souches de *M. bovis* (Cousins et al., 1993). Néanmoins, le nombre conséquent de bandes rendait son interprétation compliquée.

Le RFLP IS6110 est une méthode toutefois fastidieuse nécessitant une quantité d'ADN importante. Elle a été remplacée progressivement par la combinaison du spoligotypage et du MLVA (« *Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis* » en anglais, Analyse multilocus du nombre variable de répétitions en tandem).

### **1.2.3.2. Le spoligotypage**

Le spoligotypage a été développé à la fin des années 90 (Kamerbeek et al., 1997) et repose sur le polymorphisme dans la région CRISPR (Zhang et al., 2010). Cette région a été décrite en 1987 et est définie par une succession de séquences répétées, appelée DR (« *Direct Repeat* » en anglais) de 36 pb séparées de spacers (Ishino et al., 1987). La région CRISPR est également accompagnée d'un ensemble de gènes *cas* de type III-A (« *CRISPR associated* » en anglais) (He et al., 2012; Jansen et al., 2002; Refrégier et al., 2019).

La région CRISPR-Cas est impliquée dans un mécanisme de défense adaptatif de la bactérie lui permettant d'intégrer une séquence de l'ADN d'un prédateur (phage, plasmide...) lors de la première infection de la bactérie. Cette séquence devient un spacer qui est ajouté à la région CRISPR, entre deux séquences répétées. Les gènes *cas* peuvent utiliser la séquence lors d'une seconde infection pour reconnaître et inactiver le prédateur (Grissa et al., 2008, 2007; Li and Peng, 2019; Louwen et al., 2014). Le rôle de la région CRISPR des MTBC est encore mal compris, car elle semble ne plus acquérir de nouveaux spacers et l'évolution de cette région semble se faire par délétions, qui sont généralement dues à la recombinaison de régions répétées adjacentes ou de deux IS6110 ou par duplication (événement moins fréquent) (Fang et al., 1999; Freidlin et al., 2017; Gao et al., 2017; Hancock, 1995). Néanmoins une récente publication a mis en évidence la capacité de cette région à détruire l'ADN étranger plasmidique (Refrégier et al., 2019; Wei et al., 2019). Il a également été montré que les gènes *Cas* pourraient jouer un rôle dans le stress des mycobactéries (Refrégier et al., 2019; Wei et al., 2019; Yang et al., 2021). Le spoligotypage est une méthode basée sur la PCR qui a été largement utilisée pour le génotypage des membres du MTBC (Kamerbeek et al., 1997). Elle implique l'amplification de régions codées par le chromosome qui contiennent un nombre variable de courtes séquences répétées directes entrecoupées de spacers non répétitifs. Le macroarray spoligotype peut être dessiné sur membrane, sur la technologie Luminex qui est utilisée au LNR. Le spoligotype peut également être déduit par séquençage (voir partie 1.4. **Le séquençage de *M. bovis* et son application**) (Aranaz et al., 1996; Guyeux et al., 2021; Haddad et al., 2001; Hauer et al., 2015; Kamerbeek et al., 1997; Zhang et al., 2010).

Le motif du spoligotype détermine un code binaire (présence=1 et absence=0) qui correspond à un profil de type SBNNNN en accord avec une convention internationale (Figure 9) (Smith, 2012). La mise en œuvre de protocoles et d'une nomenclature normalisée pour l'identification et la désignation des spoligotypes ainsi que la création de bases de données consultables en ligne, sur le site <https://www.mbovis.org>, pour la comparaison des profils ont grandement

facilité la comparaison inter-laboratoires des spoligotypes pour le suivi des souches et l'épidémiologie.

Le pouvoir discriminant du spoligotypage est bien plus grand que celui du RFLP-IS6110 pour l'étude des souches de *M. bovis*. L'utilisation de cette technique en 2001 avait permis d'identifier 161 spoligotypes pour 1349 isolats de *M. bovis*, ce qui avait permis d'observer une clusterisation de certains isolats et la présence élevée dans le panel étudié de deux spoligotypes appelés BCG-like / SB0120 et GB54 / SB0121 (le numéro SB correspond à la nomenclature internationale tandis que BCG-like et GB54 sont alias utilisés dans les rapports nationaux)(Haddad et al., 2001). La combinaison de cette technique avec le MLVA permet d'améliorer le pouvoir discriminant et de regrouper plus finement les souches par génotype (Azé et al., 2015).

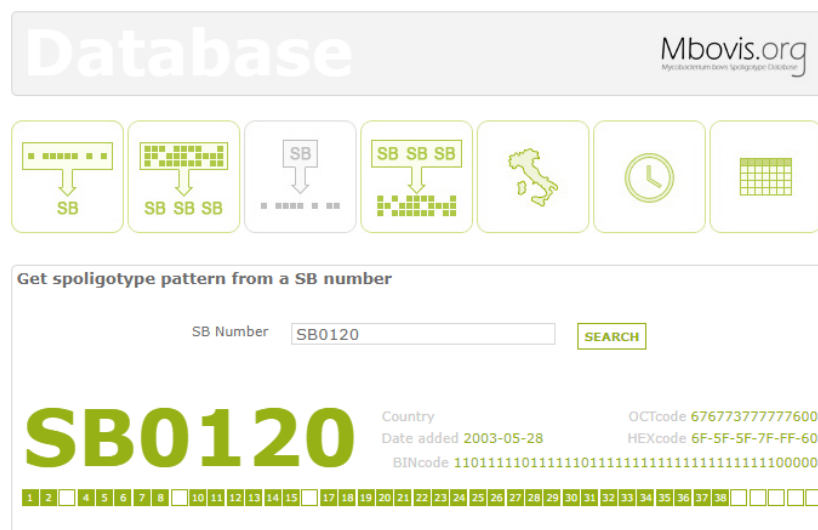


Figure 9 : Profil d'une souche de spoligotype SB0120 déterminé sur le site <https://www.mbovis.org> sont également renseignés le pays où le spoligotype a été trouvé (pas présent ici), la date d'ajout et son code binaire (1=présence du spacer, 0= absence du spacer).

### 1.2.3.3. Le typage MLVA

Le typage MLVA (« *Multiple Loci VNTR Analysis* » en anglais) correspond à l'analyse de marqueur de type MIRU (« *Mycobacterial interspersed Repetitive Unit* » en anglais). Ces marqueurs sont composés de VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) qui sont des séquences d'ADN à nombre variable répétées en tandem, de ETR (*Exact Tandem Repeat*) qui sont des répétitions en tandem de séquences identiques et de QUB (Queen University of Belfast) (Millet et al., 2007; Supply et al., 2006, 2001).

Le nombre de répétitions de ces séquences permet de donner une chaîne de caractères définissant le profil de la souche. La discrimination de cette technique peut augmenter avec le nombre de séquences utilisées qui peut être de 12, 15 ou 24 pour le typage de *M. tuberculosis*

(Supply et al., 2006, 2001). Plusieurs études ont également suggéré que plus la diversité génétique et le nombre de séquences ciblées sont élevés, plus l'impact de l'homoplasie est faible (Comas et al., 2009; Luo et al., 2012; Reyes et al., 2012). Le Consortium Européen Venomyc a sélectionné 6 régions génomiques pour le typage MLVA qui ont été additionnées de 2 régions identifiées comme très variables pour les souches françaises de *M. bovis* (Hauer et al., 2016). Ces régions sont les suivantes : ETR A, ETRB, ETRC, ETRD, QUB 11a, QUB 11b, QUB3232 et QUB 26. Le résultat final est un profil allélique transformé en un code numérique de 8 chiffres, qui peut également être introduit dans des bases de données internationales à des fins de comparaison, comme la base de données MIRU-VNTRplus (Weniger et al., 2010). Une application web développée par INRAe « *M. bovis* Datatype » permet de consulter en libre accès des profils MLVA et de spoligotypage (<http://mbov-type.tours.inra.fr>). Ces outils ont pour but de permettre des comparaisons inter-laboratoires de ces profils.

La combinaison de cette technique avec le spoligotypage permet de réduire les risques d'homoplasie et offre une fine différenciation des souches qui a permis d'identifier 498 génotypes de *M. bovis* en France entre 1978 et 2013 (Hauer et al., 2015). La grande diversité de profils moléculaires permet de déterminer l'origine de l'infection d'un nombre important de foyers et de mettre en évidence d'éventuelles transmissions inter-espèces (Hauer et al., 2016, 2015; Rodriguez-Campos et al., 2013). Cependant, même la méthode de génotypage combinée ne présente pas un pouvoir discriminant suffisant pour évaluer avec précision les événements évolutifs au sein d'un cluster (ou groupe) (Guimaraes and Zimpel, 2020; Hauer et al., 2019).

### **1.3. L'épidémiologie de la tuberculose bovine**

#### **1.3.1. La tuberculose bovine dans le monde**

La bTB est une maladie à déclaration obligatoire qui est aujourd'hui largement répandue dans le monde (Cosivi et al., 1998). Entre janvier 2017 et juin 2018, 82 pays ou territoires sur les 188 signalant leur situation à l'OIE avaient déclaré des foyers de bTB (données OIE 2018). La bTB est présente sporadiquement dans les pays industrialisés où elle est souvent limitée à quelques régions (Figure 10). La bTB est reconnue enzootique dans certains pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud (selon les données de l'OIE 2022).

L'obtention d'informations sur la présence de la maladie dans certaines parties du monde peut être compliquée comme pour certains pays d'Afrique du Nord par exemple (Figure 10).

Diverses mesures ont été prises par la France à partir de 1950 comme la pasteurisation du lait, l'inspection des carcasses ou l'utilisation de l'intradermotuberculination (IDT, voir partie

1.2.1.1. **Les tests tuberculiques**) sur les bovins en première ligne de contrôle et l'abattage des animaux puis des cheptels en cas de test positif. Ces mesures ont permis de diminuer la prévalence, ce qui peut expliquer en partie la différence de prévalence observée avec certains autres pays, notamment non industrialisés. Les coûts financiers associés aux programmes d'éradication de la tuberculose animale y compris les tests, l'abattage, l'indemnisation des éleveurs, l'intervention sur la faune sauvage, le diagnostic et les investigations épidémiologiques représentent ensemble un énorme investissement pour les pays. À titre d'exemple, la France a dépensé 17 millions d'euros en 2014 pour son programme d'éradication de la bTB (Cavalerie et al., 2014).

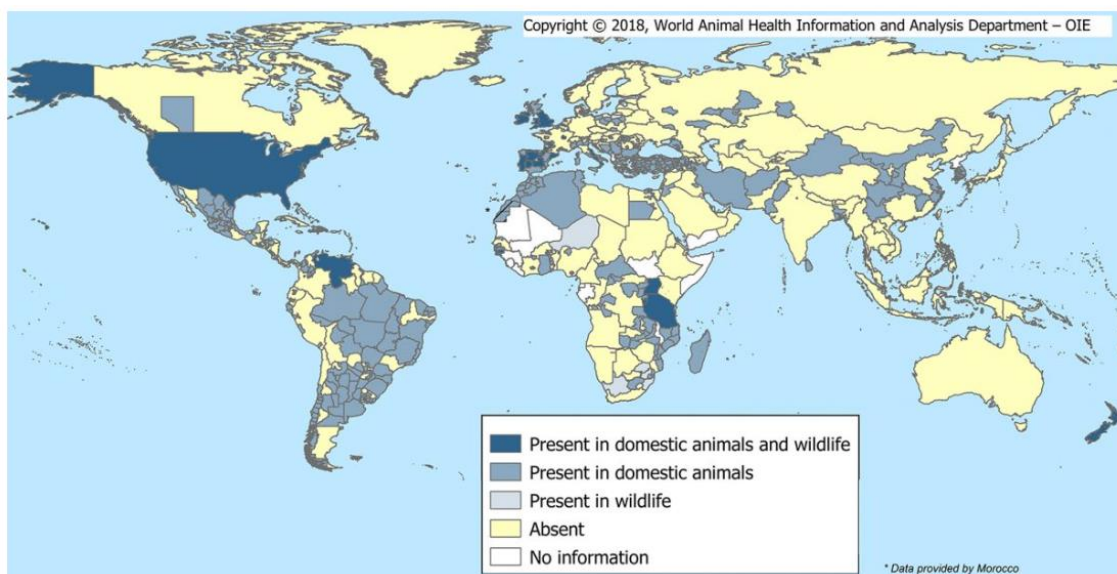


Figure 10 : Distribution de la tuberculose bovine de 2017 au premier semestre 2018 selon l'OIE (Source WAHIS <https://oiebulletin.fr/?panorama=3-01-tb-wahis-en>)

Les enjeux de la lutte contre la bTB ne sont pas les mêmes pour tous les pays. En effet, la bTB est un problème principalement sanitaire pour les pays où la maladie est très présente et enzootique, tandis que les problèmes socioéconomiques sont les plus importants pour les pays qui sont bien avancés dans l'éradication de la bTB. Les moyens mis en place et les mesures pour lutter contre la bTB sont donc différents entre les pays.

### 1.3.2. **La tuberculose bovine en Europe**

En 1964, la communauté européenne a mis en place une directive sur les problèmes de santé animale affectant les échanges intracommunautaires d'animaux pour les espèces bovine et

porcine (64/432/CEE). Cette directive a évolué au cours du temps et a permis d'éditer des réglementations communes aux pays membres pour autoriser le mouvement des animaux dans l'Union Européenne. En 2016 a été écrite la LSA en remplacement de la directive 63/432/CEE du Conseil, afin de rassembler un très grand nombre d'actes juridiques en une seule loi santé et d'harmoniser les politiques de lutte contre la bTB (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) et al., 2017). Ce texte, applicable depuis le 21 avril 2021, souligne la nécessité de prendre en compte l'épidémiologie de la maladie, les facteurs de risque, les caractéristiques des différentes populations européennes dans les stratégies mises en place par les pays et d'avoir une démarche d'analyse du risque. La LSA impose aux États membres des mesures de police sanitaire, des mesures liées aux mouvements d'animaux et des exigences en matière de biosécurité. Le statut « indemne de tuberculose » ou OTF (« *Officially Tuberculosis Free* » en anglais) a été mis en place par l'Union européenne. Il est accordé au pays membre qui a eu une prévalence annuelle en dessous de 0,1% depuis six années consécutives. Pour le maintien du statut indemne de bTB, le pays doit présenter un taux de cheptels indemnes supérieur à 99,9% au 31 décembre de chaque année, il doit démontrer une bonne capacité de surveillance et il doit respecter la LSA et les codes des différents articles mentionnés.

Ce statut est très avantageux pour le pays, car il facilite le commerce national et à l'international des animaux en allégeant les contrôles sanitaires avant leur exportation dans un autre pays (Reviriego Gordejo and Vermeersch, 2006).

Les pays membres de l'Union Européenne qui avaient le statut OTF en 2020 sont au nombre de 17 (sur 27) et 3 pays qui n'avaient pas ce statut possédaient des régions indemnes (l'Espagne, l'Italie et le Portugal) (Figure 11). L'Irlande et l'Espagne avaient les prévalences les plus élevées (dans les 27 états membres pris en compte) en 2020 avec respectivement 4,7% et 1,5% (Rapport Efsa 2021). La proportion globale de cheptels infectés au sein des pays membres a diminué de 2019 à 2020 de 0,4% ce qui peut s'expliquer par l'absence de données dû au Brexit du Royaume-Uni.



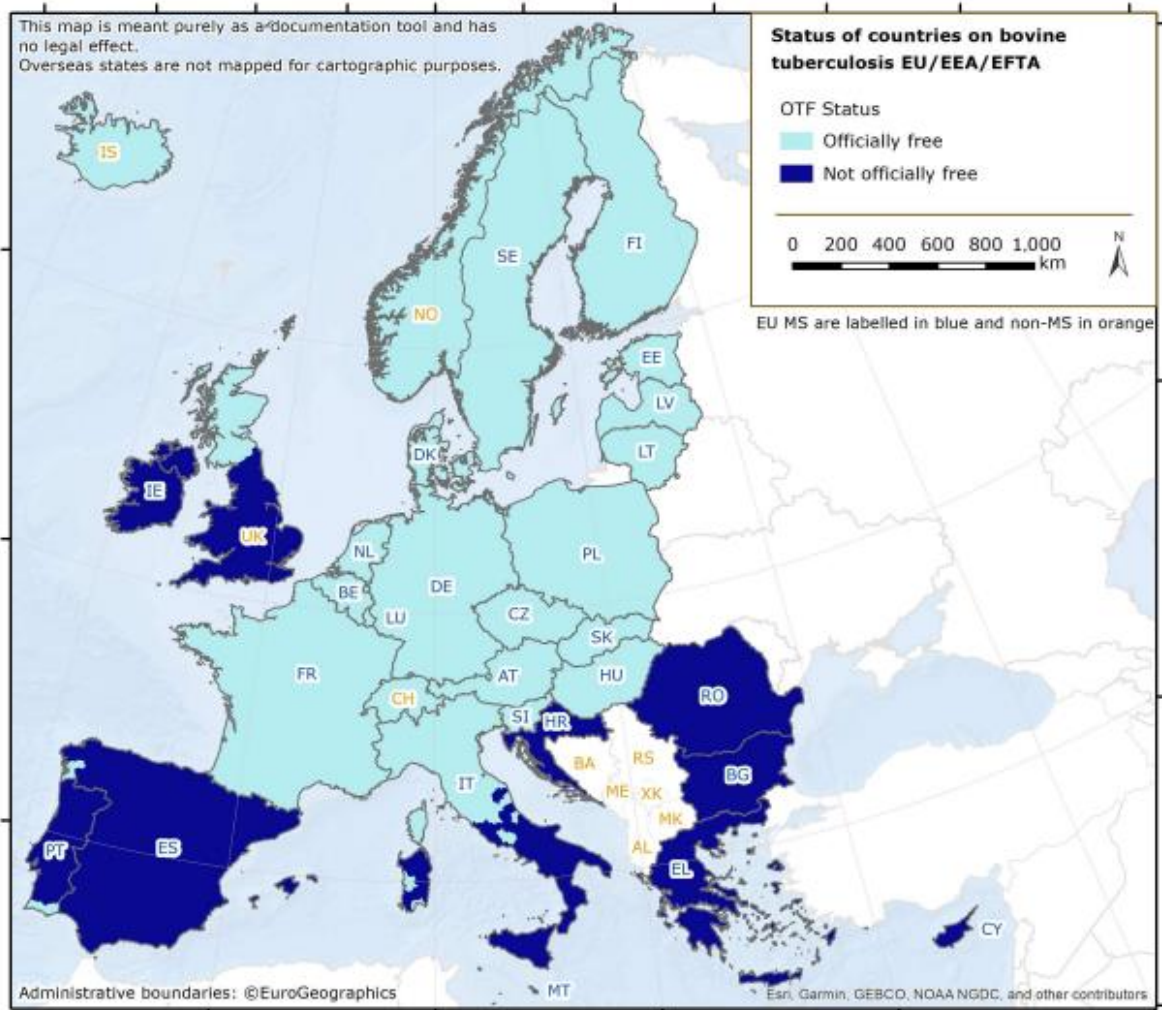


Figure 11 : Statut pour la bTB en 2020 de 27 pays membres de l'Union européenne (MS) et 9 non-membres (non-MS) selon le rapport de l'EFSA de 2021. Les pays ou région en bleu clair sont les pays indemnes de tuberculose alors que ceux indiqués en bleu foncé n'ont pas ce statut (Rapport Efsa 2021).

### 1.3.3. La situation française

#### 1.3.3.1. Mise en place des mesures pour l'éradication de la tuberculose bovine en France

Un cheptel est indemne d'infection par le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (arrêté du 8 octobre 2021) :

- lorsque tous les bovins de plus de 6 semaines ont obtenu, au cours des 30 jours après leur introduction, un résultat négatif à un test immunologique comme l'IDT ou test du dosage IFN $\gamma$  qui peuvent être complétés de toutes autres méthodes autorisées par instruction du Ministre en charge de l'agriculture (valable pour l'obtention du statut d'indemne de TB),
  - aucun bovin n'a de manifestations cliniques de TB,
  - tous les bovins proviennent de cheptel indemne,

- les animaux ayant un statut sanitaire inconnu sont détenus de façon distincte du troupeau de bovins.

Avant 1950, la bTB était très présente en France avec 25% des cheptels bovins infectés (Figure 12) (Benet et al., 2006). Cette forte prévalence avait donc un important impact socioéconomique, mais également de santé publique puisque la consommation de produits alimentaires contaminés, notamment du lait cru, pouvait entraîner des cas de tuberculose humaine due à *M. bovis*. Un premier programme de lutte contre la bTB avait pourtant été mis en place par la loi du 7 juillet 1933. Il était basé sur une prophylaxie libre et individuelle, mais n'a été suivi que par très peu d'éleveurs et vétérinaires, car elle était facultative et individuelle. C'est donc en 1954, avec la loi du 6 décembre, que la France instaura les premières bases de la prophylaxie à caractère collectif de la tuberculose bovine et mise en place le Groupement de Défense Sanitaire (GDS). Ce premier plan fut ensuite suivi par de nouveaux programmes de prophylaxie qui s'appuyaient sur celui-ci. Ce programme était basé sur le dépistage par IDS des cheptels infectés et l'assainissement sélectif des bovins répondant positivement aux tests, ainsi que sur la recherche de lésions évocatrices d'infection par des mycobactéries tuberculeuses sur les carcasses de bovins. Il a permis de diminuer la prévalence de la bTB chez les cheptels bovins à 13% en 1965. Ces mesures ainsi que d'autres comme la pasteurisation du lait ont permis la diminution de la tuberculose zoonotique. La prophylaxie est ensuite devenue obligatoire et a permis d'accentuer la diminution de la prévalence de la bTB (Figure 12) (Benet et al., 2006).

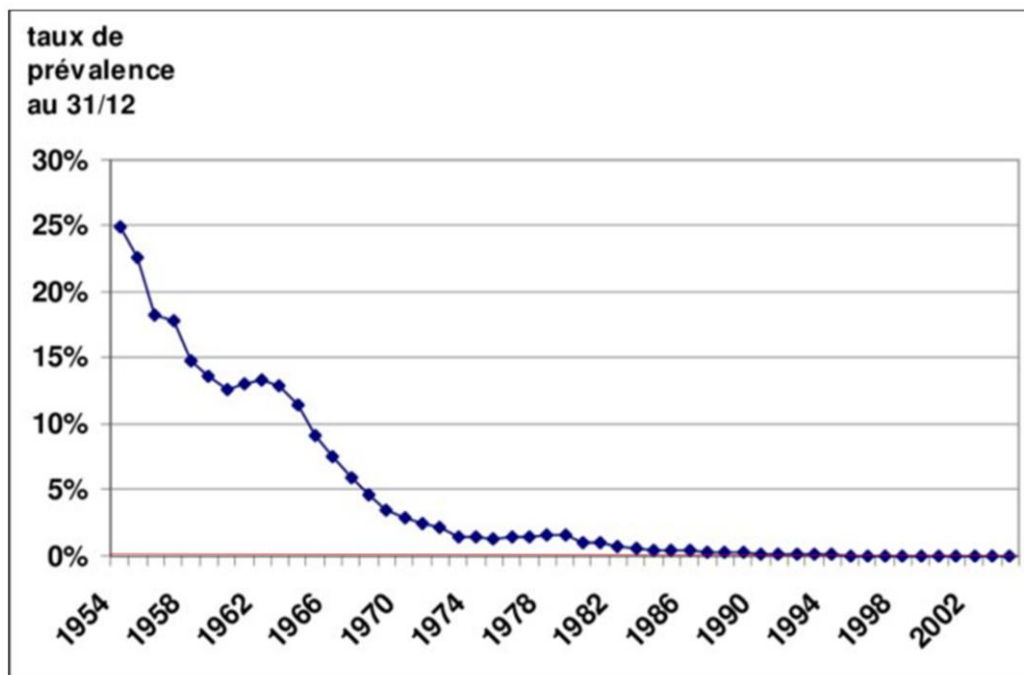


Figure 12 : Évolution de la tuberculose en France depuis 1955. Cette figure modifiée provient d'un article de Benet et collaborateurs (Benet et al., 2006). La ligne rouge représente la limite à ne pas dépasser pour conserver le statut d'indemne de bTB.

Les techniques de dépistage et de diagnostic ont évolué au cours du temps, comme la mise en place du test IDC ou la confirmation par culture des infections qui ont permis de diminuer le nombre de tests faussement positifs à la TB. La traçabilité des bovins a été améliorée avec notamment la mise en place de la carte verte en 1990 qui permet d'identifier un animal provenant de troupeau officiellement indemne de Tuberculose, Brucellose et leucose. Cet animal peut être vendu à d'autre élevage ou à l'abattoir (garanti apporté par l'Attestation Sanitaire à Délivrance Anticipé ou ASDA). Depuis 1998, un cheptel déclaré infecté de tuberculose est placé sous arrêté préfectoral de déclaration d'infection et un abattage total (ou sélectif selon l'avis du préfet et sous condition) est appliqué pour limiter la résurgence de la maladie.

La gestion des cheptels et leur structure (qui ne sont pas des mesures de lutte) ont également changé depuis 1950 en diminuant le nombre d'élevages bovins et en augmentant la taille des exploitations, ce qui a eu un impact sur la spécificité troupeau des tests. L'efficacité de ces mesures a permis une diminution de la prévalence de la bTB en France en deçà de 0,1% ce qui lui a permis en 2001 d'obtenir le statut d'indemne de TB (Benet et al., 2006).

-

La prévalence de la bTB en France de 2019 à 2020 était de 0,07% avec 104 foyers de bTB déclarés, uniquement dus à *M. bovis* (Rapport Efsa 2021). Les foyers de ces dernières années sont présents dans certaines régions très localisées (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Hauer et al., 2015), ce qui explique le rythme de prophylaxie différent entre les régions, qui peut être annuel à quinquennal ou même sans surveillance dans les régions qui ne sont pas considérées à risque (Figure 13).

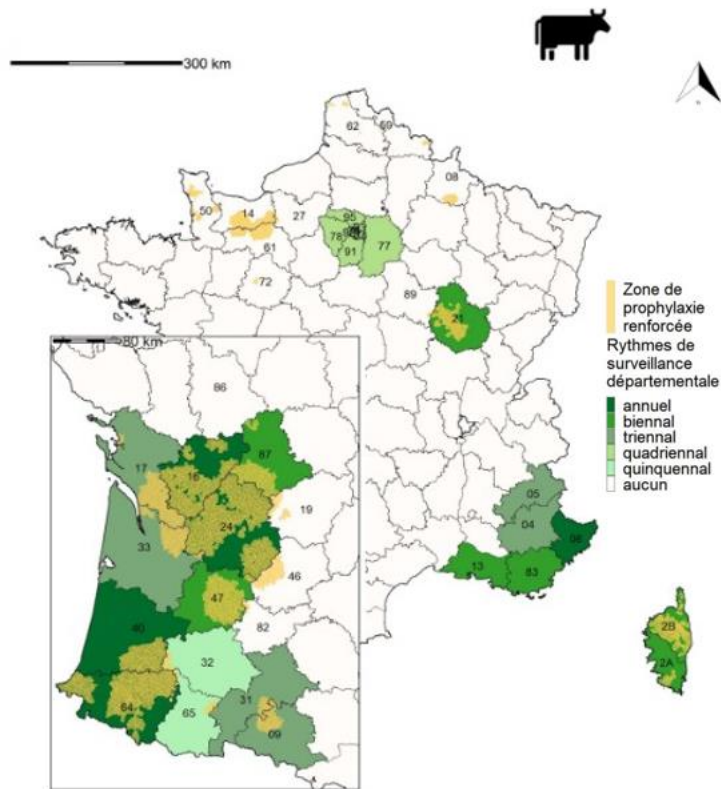


Figure 13 : Différents niveaux de surveillance de la bTB dans les cheptels en France en 2020 (Forfait et al., 2022).

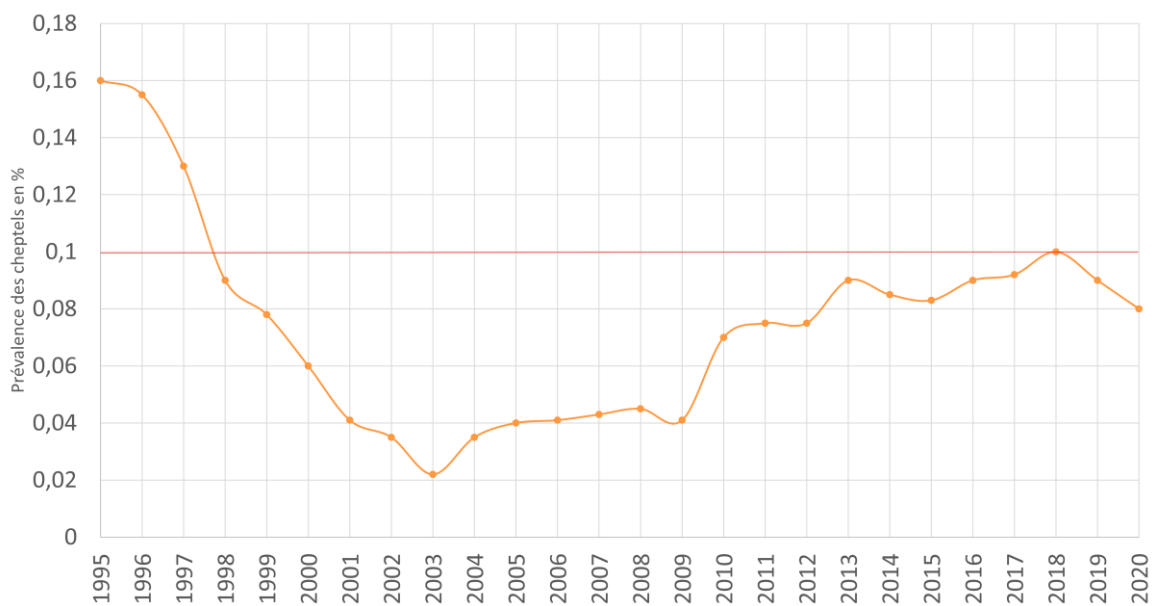


Figure 14 : Évolution de la prévalence de la tuberculose bovine en France de 1995 à 2020 (Delavenne et al., 2020; Forfait et al., 2022). La ligne rouge représente la limite à ne pas dépasser pour conserver le statut d'indemne de bTB.

Après 2001 et l'obtention du statut d'indemne de tuberculose, la prévalence a augmenté dès 2004 (Figure 14), principalement due au nombre croissant de cas de cheptel positifs trouvés en Côte d'Or et en Dordogne (Benet et al., 2006). Ces dernières années, elle est très proche de

0,1%, ce qui menace le statut OTF de la France. Cette évolution peut s'expliquer en partie par l'augmentation de la pression de la surveillance mais également par l'évolution des systèmes d'élevage et l'apparition de nouveaux facteurs de risque de la maladie. En effet, au cours des 30 dernières années, il y a eu une très forte diminution du nombre de vaches dans les cheptels laitiers qui ont été remplacés par des vaches allaitantes de races spécialisées très productrices en viande (Boschioli and Bénét, 2014).

En complément de la partie **Erreur ! Source du renvoi introuvable. Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, les bovins allaitants ont un âge de réforme plus élevé que les vaches laitières (respectivement 7 à 15 ans contre 5 à 8). Bien qu'il soit difficile de faire le parallèle entre l'évolution de la bTB et celles des structures, une relation de l'infection à TB avec le cheptel allaitant est trouvée actuellement en France. En effet, 80% des cheptels infectés en France à l'heure actuelle sont des cheptels allaitants (Delavenne et al., 2020).

D'autres facteurs liés à l'élevage des vaches allaitantes peuvent également expliquer la différence de prévalence entre cheptels allaitants et cheptels laitiers.

L'utilisation de nombreuses pâtures dispersées dans l'espace, entremêlées avec celles utilisées par d'autres cheptels augmente le contact fil à fil des animaux de différents cheptels (donc le voisinage), a cela s'ajoute un pâturage prolongé dans l'année, qui favorise également le risque de contamination environnementale et d'exposition à la faune sauvage. Les cheptels sont généralement plus grands avec des pâtures éparpillées et des animaux qui sont moins faciles à manipuler et à surveiller.

#### **1.3.3.2. La tuberculose dans la faune sauvage en France et le réseau Sylvatub**

L'évolution lente mais régulière peut être également en partie expliquée par la présence de l'infection par *M. bovis* au sein de la faune sauvage, qui permet l'entretien et la réinfection de cheptels dans certaines zones (Duault et al., 2022; Kean et al., 1999; Naranjo et al., 2008; O'Brien et al., 2002; Simpson, 2002; Zanella et al., 2008). en France, le premier foyer de TB dans la faune sauvage a été découvert en 2001 dans la forêt de Brotonne (Seine-Maritime et Eure) chez des cervidés (*Cervus elaphus*) et des sangliers (*Sus scrofa*) (Hars et al., 2013; Zanella et al., 2008). L'aggravation de la situation sanitaire en 2005 et 2006 dans cette région a nécessité l'abattage total des cervidés, considérés comme des hôtes de maintien de la bactérie, et la diminution de la densité des sangliers considérés alors comme des hôtes de liaison de *M. bovis* (Zanella et al., 2008).

Des cas de TB dans la faune sauvage ont par la suite été détectés dans d'autres régions et sur d'autres espèces. Le rôle épidémiologique du sanglier (*Sus scrofa*) a été décrit précédemment. Des sangliers infectés ont été retrouvés dans plusieurs régions comme la Côte d'Or ou la Dordogne (Hars et al., 2013; Réveillaud et al., 2018). Le sanglier est considéré en Espagne comme un hôte clef de l'épidémiologie de *M. bovis* (Gortazar et al., 2003; Vicente et al., 2013). L'infection à *M. bovis* du blaireau (*Meles meles*) a initialement été détectée en 2009 en Côte d'Or et représente le plus grand nombre cas d'animaux infectés dans la faune sauvage en France (Réveillaud et al., 2018). Le rôle épidémiologique du blaireau n'a été étudié en détail qu'en Côte-d'Or, où il joue un rôle d'hôte de liaison. Ailleurs, ce rôle reste à préciser, même si les données historiques viennent conforter l'hypothèse qu'il jouerait le rôle d'hôte de liaison (rapport ANSES). Il a été montré que le taux de transition blaireau à bovin était plus élevé que celle du bovin au blaireau sans qu'il puisse être montré qu'il jouerait un rôle d'intermédiaire entre les cheptels (Duault et al., 2022). Le renard (*Vulpes vulpes*) peut vivre dans des terriers de blaireaux, ce qui favoriserait la transmission de *M. bovis*. Le nombre de renards infectés était jusqu'à récemment faible dans les zones enzootiques de TB. Cependant, un nombre croissant de rapports ont identifié des renards infectés dans des régions où la TB est très répandue (Matos et al., 2016; Millán et al., 2008). Plusieurs études ont ensuite proposé que le renard pourrait jouer un rôle dans l'épidémiologie de *M. bovis* (Michelet et al., 2018b; Richomme et al., 2020). L'infection à *M. bovis* du chevreuil (*Capreolus capreolus*) est également retrouvée sporadiquement en France.

Ces données collectées pour mieux comprendre la situation de la maladie dans la faune sauvage ont été permises par la création en France en 2001 d'un réseau de surveillance épidémiologique de la TB dans la faune sauvage appelée Sylvatub dans le cadre de la Plateforme ESA (Epidémiosurveillance Santé Animale) à l'initiative du ministère en charge de l'agriculture (DGA). Il permet de respecter les axes définis par l'OMSA, l'OMS et la FAO dans la feuille de route pour la lutte contre la tuberculose zoonotique concernant la réduction des interfaces de transmission entre les humains et l'animal (World Health Organization et al., 2017). Les objectifs de cette surveillance sont :

- de détecter de manière harmonisée la présence de la TB dans les espèces sauvages sensibles en France métropolitaine,
- de suivre l'évolution du niveau d'infection chez la faune sauvage,
- de surveiller une éventuelle extension géographique de la maladie au-delà des zones infectées,

- de partager des informations scientifiques et des connaissances techniques relatives à la TB dans la faune sauvage,
- de caractériser les souches de mycobactéries isolées chez les animaux sauvages sur l'ensemble du territoire français.

Trois niveaux de surveillance ont été établis par Sylvatub. Ceux-ci sont définis selon la présence locale de foyers bovins, la dynamique de l'infection chez les bovins, la présence d'infection dans la faune sauvage et la proximité géographique d'une zone infectée à haut risque et peuvent varier si la situation épidémiologique évolue dans le temps. Ainsi les 3 niveaux sont classés par ordre de risque, le niveau 3 étant le niveau le plus élevé (Figure 15). Le premier niveau de surveillance est évènementiel et basé sur la recherche de lésions suspectes des cervidés et sangliers par les chasseurs ou de lésions évocatrices de TB chez les sangliers, blaireaux ou cervidés collectés par le réseau SAGIR (animaux morts ou mourants). Le deuxième niveau est complété par une surveillance renforcée et la recherche analytique systématique par un LDA (Laboratoire départemental d'analyse) agréé pour le diagnostic de la tuberculose dans le cadre du renforcement du réseau SAGIR. Le troisième niveau est additionné d'une recherche systématique bactériologique pour les blaireaux et pour les sangliers (ou recherche sérologique pour les sangliers) au LDA à partir d'animaux prélevés de zones à risque (Forfait et al., 2022). Le blaireau (*Meles meles*), le sanglier (*Sus scrofa*), le cerf (*Cervus elaphus*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*) sont les espèces sauvages surveillées par ce dispositif.

La confirmation de l'infection tuberculeuse d'un animal est obtenue par culture bactérienne ou PCR lorsque *M. bovis*, *M. caprae* ou *M. tuberculosis* est retrouvé (en accord avec l'arrêté du 8 octobre 2021).

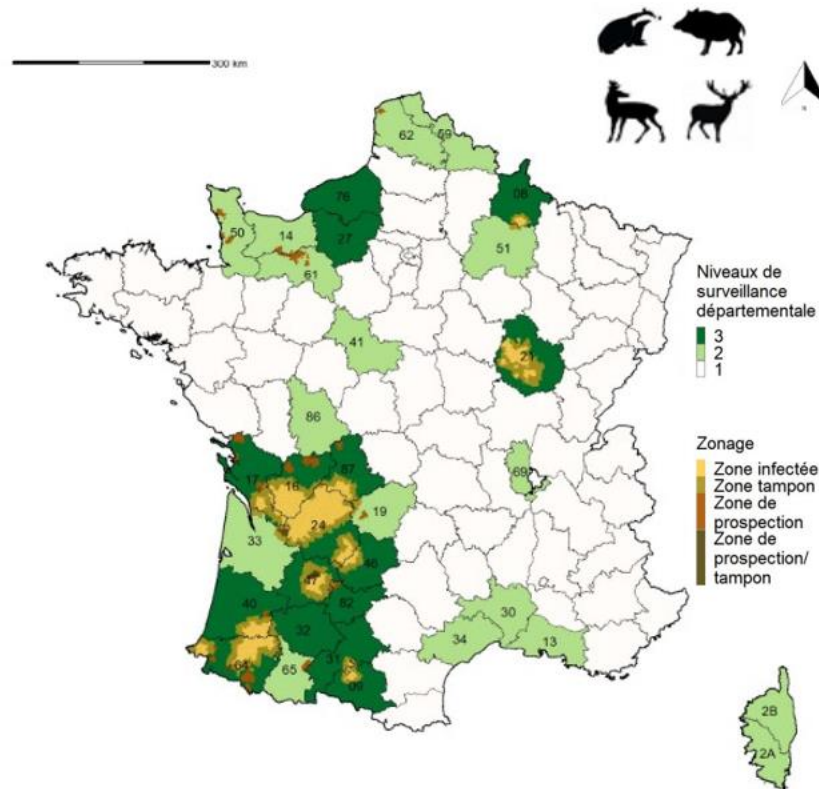


Figure 15 : Différents niveaux de surveillance de la tuberculose dans la faune sauvage mise en place par Sylvatub pour l'année 2020 (D'après Forfait et al., 2022).

Cette surveillance a permis d'approfondir les connaissances sur la circulation de *M. bovis* dans la faune sauvage et sur sa transmission entre la faune sauvage et les cheptels. Il a pu être mis en évidence que la présence d'animaux sauvages infectés est fréquemment en corrélation avec la présence d'infection chez les bovins, aires des zones géographiques communes, mais aussi des zones de similitude génotypique (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Duault et al., 2022; Hauer et al., 2015; Michelet et al., 2020b; Richomme et al., 2010; Zanella et al., 2008).

#### **1.3.4. Les génotypes des souches de *Mycobacterium bovis* françaises**

L'analyse génotypique des souches au cours du temps a permis de montrer une augmentation du nombre de souches isolées et du nombre de génotypes décrit entre 1978 et 2000. Cela peut s'expliquer par le fait que l'isolement des souches n'était pas systématique et a été instauré au fil du temps (Figure 16) (Hauer et al., 2015). L'augmentation du nombre de souches isolées a également été observé entre 2000 et 2011 alors que le nombre de génotypes avait diminué.

Cette réduction de la variabilité génétique au cours du temps peut être expliquée en partie par l'efficacité du programme de lutte contre la bTB qui a provoqué un goulot d'étranglement de la diversité des souches. Cette sélection est également accompagnée d'une régionalisation des foyers de bTB.



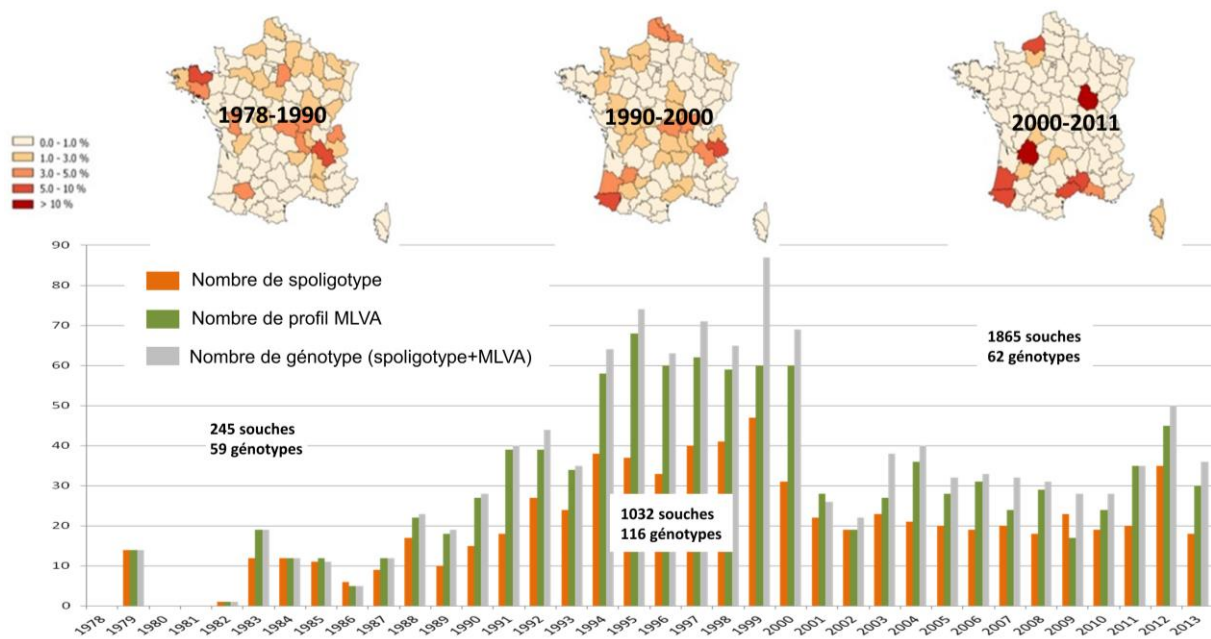


Figure 16 : L'évolution génétique de *M. bovis* en France entre 1978 et 2013. Cette figure modifiée provient de l'article (Hauer et al., 2015).

La forte régionalisation est toujours retrouvée ces dernières années comme cela peut être observé sur la Figure 17 présentant les foyers de bTB répertoriés en 2020. Les foyers de bTB sont aujourd'hui majoritairement retrouvés en Dordogne, en Haute-Vienne, dans les Pyrénées Atlantiques et en Corse ainsi qu'en Côte d'Or, même s'il y a moins de foyers déclarés ces 5 dernières années dans cette région. La surveillance de la faune sauvage et la prophylaxie sont donc renforcées dans ces régions (Figure 15).

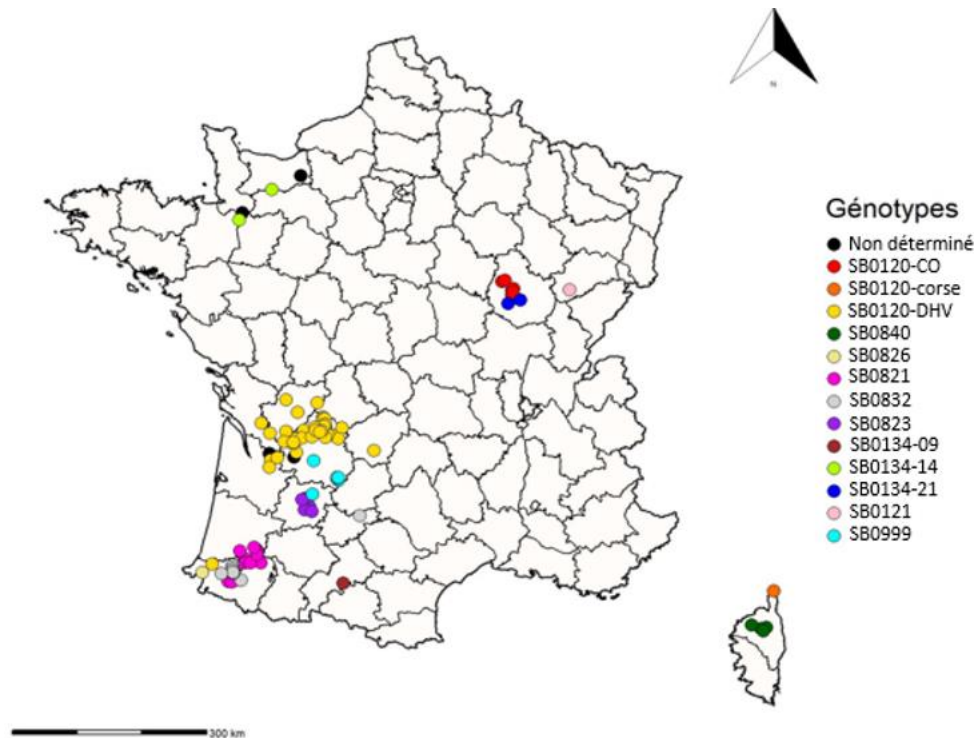


Figure 17 : Répartition géographique des différents génotypes de *Mycobacterium bovis* identifiés en élevage bovin en France métropolitaine en 2020 (d'après Forfait et al., 2022).

La Figure 17 indique également que ces zones très régionalisées sont dominées par des génotypes majoritaires (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Forfait et al., 2022; Hauer et al., 2015; Michelet et al., 2020b). Leur évolution dans des zones géographiques bien délimitées met en évidence l'existence de facteurs locaux permettant la propagation et le maintien entre troupeaux de ces génotypes. Les relations étroites entre troupeaux voisins (nombre et proximité des pâturages) sont certainement les principaux facteurs de risque comme il a pu être mentionné précédemment. Cependant, l'infection d'animaux sauvages et la transmission de la maladie entre la faune sauvage et les cheptels participent également au maintien de génotype dans certaines régions (Boschioli and Benet, 2014; Duault et al., 2022; Michelet et al., 2018).

## **1.4. Le séquençage de *M. bovis* et son application**

### **1.4.1. Les différents types de séquençage**

#### **1.4.1.1. Le séquençage de première génération**

Le séquençage de génomes d'agents pathogènes est de plus en plus utilisé ces dernières années. Trois générations existent au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Le séquençage de première génération a été développé en 1977 par Frederick Sanger qui a donné son nom à sa technique (Sanger et al., 1977). Le séquençage Sanger est une technique d'amplification d'une séquence d'intérêt avec une ou plusieurs amorces. Elles correspondent à des oligonucléotides complémentaires de la séquence ciblée, une ADN polymérase qui permet l'allongement de la séquence, des dNTPs (désoxyribonucléoside triphosphate) et des ddNTPs (didésoxyribonucléoside triphosphate) permettant l'arrêt de l'élongation de la séquence. Ces derniers sont présents en faible proportion, permettant d'obtenir des fragments de différentes tailles qui peuvent être lus sur de grands gels (Sanger et al., 1977).

Cette technique a ensuite été améliorée par l'ajout de fluorophore sur les ddNTPs, qui a permis d'automatiser le séquençage en une seule réaction au lieu de quatre (une pour chaque nucléotide).

Ce type de séquençage est fiable et produit des fragments d'ADN assez grands (Tableau 2). Il permet d'amplifier à prix faible une séquence d'ADN préalablement définie et dont les amorces ont été dessinées en amont du séquençage. Cette technologie est donc adaptée à l'étude de séquences spécifiques pour étudier par exemple leurs polymorphismes. L'étude de longues séquences génomiques ou de génomes complets (4,4 Mpb pour un génome de *M. bovis*) est toutefois trop coûteuse à réaliser avec cette technologie, malgré le fait qu'elle ait permis le séquençage des premiers génomes mycobactériens comme H37Rv, le génome de référence de *M. tuberculosis* et AF2122/97 le génome de référence de *M. bovis* (Brosch et al., 1999; Garnier et al., 2003).

#### **1.4.1.2. Le séquençage de deuxième génération**

Le séquençage de deuxième génération a été développé en 2005 et regroupe de nombreuses techniques développées par différentes entités comme Roche, qui se base sur l'amplification de l'ADN par PCR en émulsion et sur le pyroséquençage, ou encore la technologie Illumina. Cette dernière est basée sur le séquençage par synthèse, qui est capable d'utiliser en parallèle plusieurs millions de fragments d'ADN qui sont identifiés avec des adaptateurs intégrés et distincts.

Tableau 2 : [Comparaison des trois générations de séquençage en prenant en exemple un appareil de première génération et 2 appareils de chacune des deux autres générations](#) (Amarasinghe et al., 2020; Fox et al., 2014; Liu et al., 2012; Mardis, 2008; Sahlin and Medvedev, 2021; Stoler and Nekrutenko, 2021).

Génération de séquençage	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>		
Nom de l'appareil	3730 DNA Analyzer	Roche (GS FLX+)	Illumina Miseq	MinION	Sequel
Technologie	Séquençage sanger	Pyroséquençage	Séquençage par synthèse	Nanopore mesurant un courant électrique	Séquençage d'une molécule d'ADN en temps réel
Longueur de la séquence (pb)	300 - 1 000	700	50 - 500	10 000-30 000	10 000 - 15 000
Nombre de lecture de séquences produites	96	200 000	30 000 000	1 000 000	500 000
Taux d'erreur	0,10%	0,10%	<1%	<5%	10%
Temps d'acquisition	20min à 3h	23h	1 à 11 jours	3 jours	30min à 6h
Prix par utilisation (dollars)	<10	7 000	700-6 000	400-900	850
Prix de l'appareil (dollars)	6 000	500 000	900 000	1 000	350 000
Avantages	Lecture de séquence longue. Très peu d'erreur. Rapide.	Lecture de séquence longue. Très peu d'erreur. Rapide.	Peu d'erreur. Rendement très élevé.	Lecture de séquences très longues. Appareil peu cher et facilement transportable.	Lecture de séquences très longues.
Inconvénients	Faible rendement. Cher pour des projets de séquençage de génome complet.	Faible rendement. Cher pour des projets de séquençage de génome complet.	Séquences courtes.	Beaucoup d'erreurs.	Beaucoup d'erreurs.

L'amplification clonale de chaque fragment d'ADN forme des clusters de plusieurs centaines de copies qui pourront ensuite être amplifiés avec des dNTPs marqués avec des fluorophores spécifiques. Au cours de chaque cycle, un unique dNTP est inséré au brin complémentaire de l'ADN d'intérêt qui, après lavage, est excité par une source lumineuse. Le signal fluorescent émis est reconnu par un programme informatique qui permet de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice. Le fluorophore est ensuite clivé pour pouvoir entamer un nouveau cycle.

Bien que l'équipement soit plus coûteux que pour le séquençage Sanger, cette technologie est plus rapide et permet de générer beaucoup de données à un coût faible (Tableau 2). Elle produit également peu d'erreurs en comparaison des technologies de troisième génération. Les erreurs de la technologie Illumina sont souvent dues à la lecture des séquences, alors que celles de la technologie Roche sont présentes plutôt fréquemment dans les homopolymères avec l'ajout d'insertions ou de délétions (D'Amore et al., 2016; Nelson et al., 2014). Les avantages de cette technologie peuvent expliquer qu'Illumina ait le plus de machines de séquençage distribuées dans le monde (Goodwin et al., 2016; Shendure et al., 2017). La comparaison de génomes entiers et la recherche de mutations (WgSNP) ou l'identification de plusieurs espèces au sein d'un même échantillon (metabarcoding) sont des exemples d'applications adaptées à cette technologie. Le séquençage de deuxième génération n'est cependant pas recommandé pour la construction de génomes complets et l'étude de structures génétiques larges. En effet, les petites lectures de séquences produites ont du mal à s'aligner sur des séquences répétées ou avec des teneurs extrêmes en GC. Étant donné leur nature, des biais importants lors de l'assemblage de génomes peuvent alors se créer (Chen et al., 2013; Goldstein et al., 2019; Guimaraes and Zimpel, 2020; Moss et al., 2020). L'assemblage peut également être fait *de novo* ce qui veut dire qu'aucune référence n'est utilisée. De nouveau, cette stratégie peut se heurter à des séquences répétitives et à des duplications segmentaires plus longues que les longueurs de lecture générées, ce qui peut aboutir à l'impossibilité de reconstruire sans ambiguïté la séquence pouvant entraîner un nombre important de contigs (Alkan et al., 2011). Plusieurs outils ont été développés pour aider à l'assemblage des génomes mais ils peuvent être chronophages et ne permettent pas toujours une résolution parfaite (Chitsaz et al., 2011; Page et al., 2016; Zerbino and Birney, 2008).

### **1.4.1.3. Le séquençage de troisième génération**

Le séquençage de troisième génération est apparu en 2012 et se distingue par la capacité de séquencer une seule molécule d'ADN sans aucune amplification. Plusieurs entités ont également développé leur méthode comme Oxford Nanopore (MinION) ou Pacific Bioscience (PacBio). La technologie PacBio utilise une ADN polymérase qui est fixée au fond d'un puits et permet d'incorporer des nucléotides libres marqués par une molécule fluorescente différente selon le nucléotide. Quand l'enzyme incorpore un nouveau nucléotide, elle libère le marqueur fluorescent qui génère un signal lumineux pouvant être détecté et interprété par un ordinateur. La technologie du MinION détermine l'ordre dans lequel les nucléotides sont disposés, à l'aide de nanopores dans lesquels la séquence d'ADN passe et crée une différence de potentiel. Le courant électrique varie de manière différente selon le nucléotide rencontré (A, T, C ou G), ce qui permet de déterminer la séquence d'ADN.

Le séquençage de troisième génération permet de déterminer de longues lectures de séquences de plus d'une dizaine de kb (Tableau 2). Alors que les appareils de PacBio (Sequel présenté ici) soit onéreux, le MinION présente un prix plus bas que tous les appareils présentés dans le Tableau 2. Le coût d'un séquençage de troisième génération reste néanmoins plus élevé alors que le débit est plus faible en comparaison avec un séquençage Illumina (Logsdon et al., 2020). Ces technologies demandent une quantité importante d'ADN de grande qualité (Tedesoo et al., 2021). L'autre problème principal de ces technologies vient du fait que les lectures de séquences comportent un taux d'erreur assez important. Les erreurs de MinION ont une fréquence 3 fois plus élevée de substitutions entre les bases C et T, et entre les bases A et G en comparaison avec les transversions, ce qui peut s'expliquer par les similitudes chimiques élevées des purines (A et G) et des pyrimidines (C et T) (Delahaye and Nicolas, 2021). Un autre type d'erreur peut concerner les homopolymères et notamment l'exactitude de leur longueur. Il est en effet estimé que près de la moitié des erreurs de séquençage sont dues aux homopolymères et qu'elles peuvent dépendre de leur longueur et du pourcentage de GC de cette séquence (Delahaye and Nicolas, 2021; Wick et al., 2019). Des outils de polissage des lectures de séquences générées peuvent être appliqués comme Medaka, Arrow ou Nanopolish pour réduire le taux d'erreur, de ces technologies (Loman et al., 2015; Wick et al., 2019).

Le séquençage de troisième génération est donc utilisé pour assembler des génomes complets, notamment pour des espèces très hétérogènes avec des génomes très peu stables (pan-génome ouvert). Ce type de séquençage peut également être utilisé pour étudier les structures génétiques comme les indels, difficiles à retrouver avec le séquençage de deuxième génération.

Afin d’obtenir un génome complet et fermé avec le moins d’erreurs possible, un assemblage hybride peut être utilisé. Un premier assemblage obtenu avec des données de séquençage de troisième génération peut ensuite être corrigé avec des données de deuxième génération (Ashton et al., 2015; Branger et al., 2020; Goodwin et al., 2015; Koren et al., 2012; Peker et al., 2021). Cent-cinquante-deux génomes de *M. bovis* complets ou fragmentés sont disponibles en date d’août 2022 sur NCBI (Tableau 3). Ce chiffre est faible en comparaison des 6950 génomes complets de *M. tuberculosis*. La grande majorité des séquences déposées ont été obtenues avec des technologies de deuxième génération pour les deux agents pathogènes. Cette observation indique que la majorité des études développées sont basées sur la détection de SNP à l’aide de données de séquençage à lectures courtes qui sont suffisantes pour ce type d’analyse (Guimaraes and Zimpel, 2020). Au contraire, seulement 30 SRA (« *Sequence Read Archive* » en anglais, lecture de séquences archivées ADN) provenant des technologies Oxford nanopore et PacBio sont actuellement disponibles pour *M. bovis*. Cette observation est également retrouvée pour *M. tuberculosis*. La différence peut s’expliquer en partie par le fait que les technologies de troisième génération sont plus récentes et donc moins présentes dans les laboratoires du monde. Il est donc important de bien prendre ce virage technologique et de combler ce manque de données, ce qui est très important pour l’assemblage de génomes complets et pour l’étude des structures génétiques mal prises en charge par les technologies de séquençage de deuxième génération.

Tableau 3 : Tableau présentant les génomes et données SRA (« *Sequence Read Archive* » en anglais, lectures de séquences archivées ADN) par technologies de séquençage, qui sont disponible sur NCBI (Centre national d’information sur les biotechnologies) en août 2022 pour *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*.

Espèce	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>
Nombre de génomes complets	6950	152
Nombre de SRA ADN	151 012	8502
- Illumina	147072	8462
- Ion torrent	1343	10
- Oxford nanopore	987	16
- PacBio	582	14

## 1.4.2. Le séquençage du MTBC

### 1.4.2.1. Génomomes de référence et complexe clonaux

*M. tuberculosis* H37Rv a été le premier membre du genre *Mycobacterium* à faire l'objet d'un séquençage génomique complet, révélant un génome de 4 411 532 pb, 3906 séquences codantes (CDS) et a un contenu GC élevé (65,61%) (Tableau 4) (Cole et al., 1998). L'obtention de cette séquence a également permis de confirmer les grandes caractéristiques du génome de *M. bovis*, mais aussi mieux connaître d'autres particularités du génome des mycobactéries tuberculeuses, avec notamment deux grandes familles de protéines qui présentent des domaines N-terminaux conservés, contenant soit de la proline-glutamine (PE) soit de la proline-proline-glutamine (PPE) et des domaines C-terminaux variables (Guimaraes and Zimpel, 2020).

Tableau 4 : Caractéristiques de 5 génomes complets de MTBC dont les séquences sont disponibles sur le site NCBI (Centre national d'information sur les biotechnologies).

Nom	H37Rv ( <i>M. tuberculosis</i> )	AF2122/97 ( <i>M. bovis</i> )	BCG Pasteur 1173P2	BCG Tokyo 172	Mb3601 ( <i>M. bovis</i> )
Séquence	NC_000962.3	LT708304.1	AM408590.1	AP010918.1	NZ_LR699570.1
Années de séquençage	1998	2003	2007	2009	2020
Groupe clonal	<i>M. tuberculosis</i>	Eu1	Eu3	Eu3	Eu3
Taille (pb)	4 411 532	4 349 904	4 374 522	4 371 711	4 365 068
%GC	65,61	65,64	65,64	65,64	65,64
CDS	3 906	4 000	3 988	3 984	4 042

C'est ensuite en 2003 que le génome de *M. bovis* AF2122/97 a été séquencé en totalité pour la première fois à partir d'une souche isolée d'une vache en Angleterre (Garnier et al., 2003). Comme il s'agissait du premier génome de *M. bovis* disponible, AF2122/97 est devenu le génome de référence pour *M. bovis*. Il est plus petit que le génome de référence H37Rv avec 4 345 492 pb. Le génome de *M. bovis* présente un %GC de 65,64, ce qui est proche de celui de H37Rv et qui est compris entre les 61 et 71% retrouvé chez les autres mycobactéries. Le génome de référence de *M. bovis* se distingue par 11 délétions de 1 à 12 700 pb en comparaison avec H37Rv, ainsi que 2 437 SNP (Cole et al., 1998; Smith et al., 2011). L'une des RD du génome d'AF2122/97, RD17 qui a été renommée en RDEu1, a été trouvée spécifiquement absente à un sous-groupe de *M. bovis* défini comme le complexe clonal European 1 (CC Eu1) (Figure 18) (Smith et al., 2011).



En plus de la distance phylogénétique séparant les membres de ce groupe des autres *M. bovis*, l'absence du spacer 11 dans le profil de spoligotypage a également été définie comme une caractéristique du CC Eu1. Le spoligotype majoritairement retrouvé dans ce groupe est celui du génome d'AF2122/97 qui est SB0140 (Garnier et al., 2003; Smith et al., 2011). Ce groupe est très présent dans les îles Britanniques, aux États-Unis et en Nouvelle-Zélande, ainsi que dans les anciennes colonies de l'Empire britannique (Smith et al., 2011).

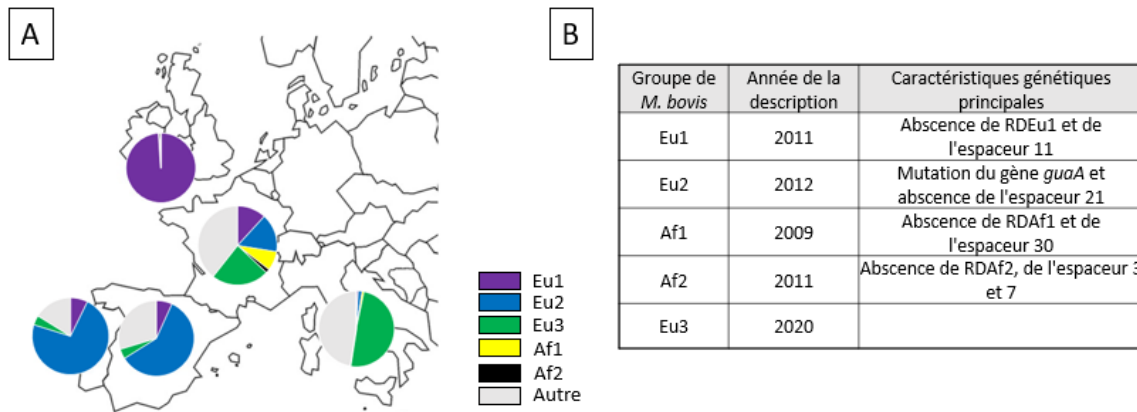


Figure 18 : A : Répartition des groupes clonaux de *Mycobacterium bovis* majoritaire en Europe. Figure modifiée provenant de l'article de Rodriguez-Campos et collaborateur (Rodriguez-Campos et al., 2014). Les membres des groupes sont phylogénétiquement bien regroupés entre eux. B : Tableau représentant l'année de description et les principales caractéristiques des complexes clonaux de *M. bovis* définies au moment de la description des groupes (Berg et al., 2011; Branger et al., 2020; Müller et al., 2009; Rodriguez-Campos et al., 2012; Smith et al., 2011).

D'autres complexes clonaux ont été décrits en Afrique. Le complexe clonal Af1 est surtout présent notamment au Mali, au Cameroun, au Nigeria et au Chad. Il se distingue par une délétion chromosomique spécifique de RDAf1 et d'une absence du spacer 30 (Müller et al., 2009). Le complexe clonal Af2 est surtout retrouvé en Afrique de l'Est et il est défini par une délétion spécifique de RDAf2 et une absence des spacers 3 et 7 (Berg et al., 2011).

Le complexe clonal Européen 2 (CC Eu2) a été défini peu de temps après CC Eu1. Ce groupe est présent en France et dans les pays ibériques comme l'Espagne ou le Portugal. Il est défini par une délétion du spacer 21 et une mutation du gène *guaA* (G→A) (Rodriguez-Campos et al., 2012). Le spoligotype majoritairement retrouvé dans ce groupe est SB0121 (Rodriguez et al., 2010).

Plus récemment, le complexe clonal Européen 3 (CC Eu3) a été décrit avec l'obtention d'un nouveau génome complet, Mb3601 (Tableau 4 et Figure 18) (Branger et al., 2020). Le nom

complexe clonal Eu3 a succédé au groupe BCG-like qui définissait les souches ayant le même spoligotype (SB0120) que les souches vaccinales (Haddad et al., 2001; Hauer et al., 2019). Ce groupe est très présent en France et en Italie (Boniotti et al., 2009; Boschioli et al., 2015; Rodriguez-Campos et al., 2014). Bien que de nombreux indels aient été décrits chez Mb3601, leur spécificité au CC Eu3 n'a pas encore été déterminée (Branger et al., 2020). Ce groupe est en revanche phylogénétiquement bien séparé des autres groupes de *M. bovis* avec des SNP spécifiques de celui-ci (Hauer et al., 2019). Eu3 est un complexe clonal phylogénétiquement proche de Af2 et il a été suggéré qu'un ancêtre commun de ces complexes clonaux a évolué en Afrique de l'Est (Loiseau et al., 2020). Af2 est ensuite resté dans cette région tandis que l'autre groupe comprenant Eu3 (unknow2 dans l'article) s'est dispersé ce qui suggèrerait une origine africaine pour Eu3, aujourd'hui très présent en Europe du Sud.

La généralisation du séquençage de ces dernières années a permis de réaliser le WGS de nombreuses souches de *M. bovis*, séquencées notamment avec la technologie Illumina (Tableau 3) (Almaw et al., 2021; Conceição et al., 2020; Hauer et al., 2019; Kohl et al., 2020; Loiseau et al., 2020; Zimpel et al., 2020). Ces données sont très utiles pour mieux comprendre l'épidémiologie de la bTB, pour réaliser des études évolutives et pour améliorer la description des groupes génétiques de *M. bovis*.

#### **1.4.2.2. Étude génomique de *M. bovis*.**

##### **1.4.2.2.1. Description de lignées de *M. bovis***

Plusieurs études ont utilisé des données de WGS pour optimiser la classification de *M. bovis* (Hauer et al., 2019; Zimpel et al., 2020; Zwyer et al., 2021). Une première étude a permis de définir 9 clusters (Cluster A à I) dans la diversité française des souches de *M. bovis* (Figure 19) (Hauer et al., 2019).

En effet, cette étude utilisant 87 génomes représentatifs de la diversité française de *M. bovis* a montré une bien meilleure distinction des groupes de souches avec le WgSNP plutôt que la méthode « classique » de génotypage utilisant le spoligotypage et le MLVA (Figure 20) (Hauer et al., 2019). Ces clusters ont été décrit selon des SNP, spoligotypes ou profil MLVA qui leur sont spécifiques.

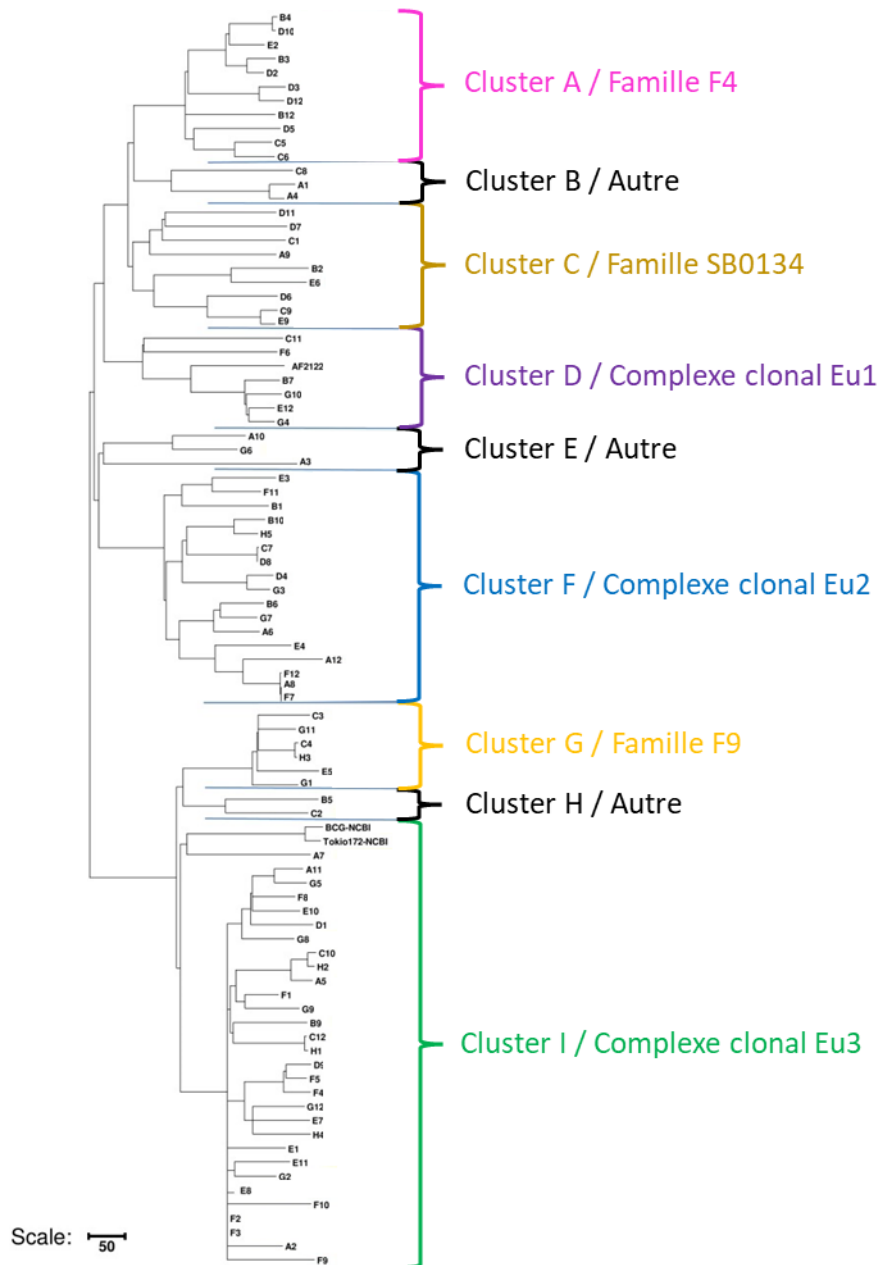


Figure 19 : Arbre de maximum de parcimonie basé sur 9 170 SNP qui a été obtenu par l'alignement de 87 génomes de *Mycobacterium bovis* sur le génome de référence AF2122/97. La figure modifiée provient de l'article de Hauer et collaborateurs (Hauer et al., 2019) et a été créée avec MEGA4 (Tamura et al., 2007). L'arbre est subdivisé en 9 clusters décrits dans l'étude d'Hauer et collaborateur.

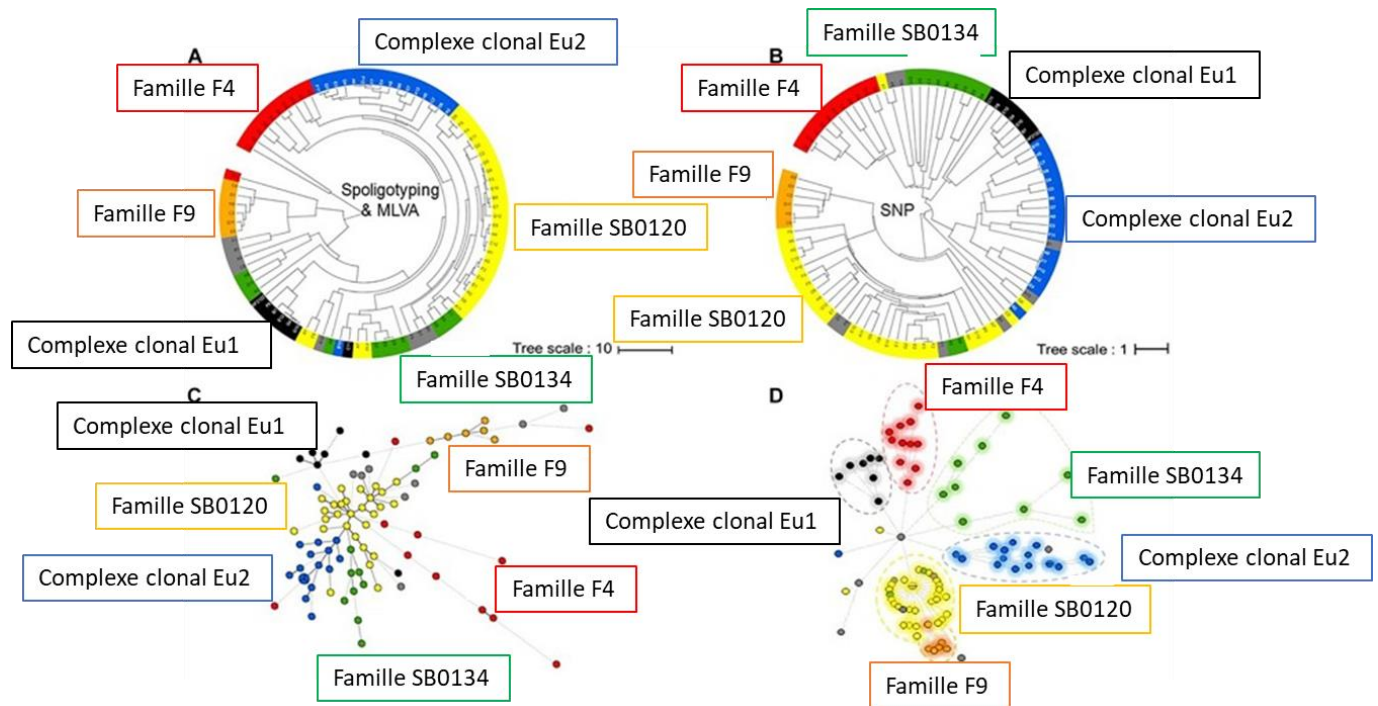


Figure 20 : Différence de discrimination entre une résolution avec les techniques de spoligotypage et de MLVA (A et C) et les SNP (9 170 SNP) (B et D). Cette comparaison prend en compte 87 génomes représentant la diversité française de *M. bovis* et utilise le génome de référence AF2122/97. Les arbres phylogénétiques UPGMA A et B ont été construits avec les différentes techniques de typage. Les arbres B et D sont des arbres à portées minimales, toujours construits selon les différentes techniques de typage. Cette figure modifiée provient de l'article d'Hauer et collaborateur (Hauer et al., 2019).

Une étude plus récente s'intéressant à la diversité mondiale de *M. bovis* a proposé de classer *M. bovis* en huit sous-lignées nommées La1.1 à La1.8 et a défini une liste de SNP spécifiques de ces sous-lignées (Zwyer et al., 2021). Ces travaux, utilisant des génomes fragmentés, sont importants pour mieux connaître la diversité des souches présentes dans une zone donnée et affiner la phylogénie.

Certains clusters sont encore mal définis. L'obtention de nouveaux génomes avec des lectures courtes ou de génomes complets et fermés pourrait être utilisées pour mieux caractériser les groupes de *M. bovis*. Ces génomes complets permettraient de mettre en évidence la présence d'évènements génétiques de grande taille entre les différents groupes comme cela a été fait pour les groupes définis précédemment.

#### 1.4.2.2.2. Epidémiologie génomique

La détection et le typage de *M. bovis* ont historiquement été basés sur l'évaluation d'un ensemble limité de marqueurs génétiques, principalement par le biais de tests basés sur la PCR (Collins,

2011; Kao et al., 2016; Ramos et al., 2014). L'utilisation du spoligotypage et le MLVA permettent de déterminer des liens inter-espèces pour un même génotype comme cela a été montré dans des enquêtes épidémiologiques dans la forêt de Brotonne et de Mauny (Zanella et al., 2008) ou dans un parc de chasse (Richomme et al., 2013). En 2012, la première étude utilisant les données de génome complet a été publiée, illustrant l'utilité de cette technologie pour étudier la dynamique de transmission de *M. bovis*. Dans cette étude, les auteurs ont identifié un groupe spatio-temporellement lié de bovins et blaireaux infectés par le même génotype (spoligotype-VNTR) de *M. bovis* (Biek et al., 2012). Par la suite, cette méthodologie a été utilisée afin de mieux comprendre la propagation locale et la persistance de la tuberculose avec l'utilisation d'approches phylogéographiques bayésiennes (Trewby et al., 2016).

Les analyses de WGS ont également permis de mettre en évidence le rôle joué par les cerfs dans la transmission de *M. bovis* en Irlande (Crispell et al., 2020) ou de mettre en évidence un réseau de transmission lié à l'élevage de cervidés en France (Michelet et al., 2019). Mais l'apport majeur de cette méthodologie est la possibilité de reconstruire des scénarios de transmission dans une région enzootique de bTB comme cela a été réalisé dans de nombreux pays (Kohl et al., 2020; Perea et al., 2021; Rossi et al., 2022; Salvador et al., 2019). En effet, des modèles d'évolution plus complexes, incluant la structure de la population, ont permis de quantifier les taux de migration de *M. bovis* inter-espèces et intra-espèce. Des modèles plus complexes qui incluent les données génomiques et différentes sources de données épidémiologiques (données de mouvements, de résultats de tests de dépistage ...) permettent de réaliser des études de phylodynamie pour répondre à de nouvelles questions telles que : « Qui infecte qui ? » (i.e. chaînes de transmission), « Quel rôle jouent les espèces dans la diversification de l'agent pathogène ? », « Quelle est la dynamique d'infection dans une zone jusque-là indemne ? » (O'Hare et al., 2021; Rossi et al., 2022). D'autres paramètres peuvent être obtenus de ces analyses comme le taux d'évolution ou la date à laquelle l'ancêtre commun le plus récent de deux souches circulait, ce qui peut donner des indications sur la dynamique de transmission (Kao et al., 2016; Loiseau et al., 2020; Zimpel et al., 2020).

Ces analyses utilisent un génome de référence qui est souvent AF2122/97 pour *M. bovis*. Le complexe clonal auquel de ce génome appartient est très présent dans les îles Britanniques, mais est retrouvé beaucoup moins fréquemment dans les autres pays européens comme la France (Figure 18). Le choix du génome de référence est critique, car il peut modifier les résultats finaux (Guimaraes and Zimpel, 2020; Lee and Behr, 2016; Walter et al., 2019). Par exemple,

si un génome de *M. tuberculosis* est utilisé comme référence pour les études sur *M. bovis*, le nombre de SNP détecté augmentera considérablement, ce qui peut entraîner des erreurs dans la recherche de SNP (Dippenaar et al., 2017; Kohl et al., 2018; Walter et al., 2019). L'utilisation d'un génome complet proche des souches étudiées est donc un des paramètres importants pour l'étude des SNP. Comme cela a été présenté précédemment, un autre génome de référence, Mb3601, représentatif d'un génotype très présent en France, le SB0120-Côte d'Or, a été proposé récemment (Branger et al., 2020). L'obtention de ce génome va permettre d'améliorer l'étude des SNP sur les souches phylogénétiquement éloignées d'AF2122/97. D'autres génomes complets, spécifiques d'autres clusters de *M. bovis* sont toutefois nécessaires pour continuer ce travail.

#### **1.4.2.2.3. Analyse pan-génomique**

Les données de WGS peuvent également être utilisées pour connaître la diversité génétique de *M. bovis*. En effet, en plus d'estimer la présence des SNP intragéniques, le WGS permet de comprendre la composition du génome et sa diversité fonctionnelle. Le pan-génome est constitué de l'ensemble du répertoire de gènes d'une espèce donnée qui sont les gènes de base, partagés par toutes les souches, les gènes accessoires, qui ne sont pas présents dans toutes les souches, et les gènes uniques, qui sont présents dans une souche unique (Vernikos et al., 2015). Le génome accessoire ajoute de la diversité génétique à l'espèce et peut impliquer d'autres voies métaboliques qui peuvent permettre l'adaptation d'une souche à une niche écologique, la colonisation de nouveaux hôtes ou d'autres fonctions bénéfiques pour d'autres espèces (Golby et al., 2013; Vernikos et al., 2015). Des études multi-génomes et l'identification des mutations génétiques sont centrales dans le domaine de l'épidémiologie des maladies pour mieux comprendre les interactions hôte-pathogène, la virulence et la transmission (Cheng et al., 2018; Dong et al., 2017). Bien que le pan-génome de *M. bovis* soit encore mal connu, les génomes MTBC évoluent de manière clonale et ont des génomes accessoires supposés petits par rapport à la plupart des autres taxons (Ceres et al., 2022). L'effet combiné des indels ainsi que la présence de SNP entre les membres contribuent aux différences dans les gammes d'hôtes, la pathogénicité et la progression de la maladie.

Néanmoins ces études utilisent des génomes séquencés avec des technologies de deuxième génération qui rendent difficile leur annotation, car ils sont incomplètement séquencés et/ou contiennent des lacunes entre les contigs (Ceres et al., 2022; Reis and Cunha, 2021). L'obtention et l'utilisation de génomes complets et fermés permettront donc d'améliorer ce type d'analyse en évitant les biais précédemment cités.

## 2. Objectifs

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons décrit comment ont évolué la détection de l'infection et le diagnostic de la bTB ainsi que l'utilisation de méthodes de typage de plus en plus précises.

Nous avons également évoqué les nombreuses avancées en matière de lutte contre la maladie qui ont permis l'obtention du statut d'indemne de tuberculose en 2001. Ce statut qui est très important pour la France est aujourd'hui menacé par la résurgence de la bTB. Nous avons également mentionné que les foyers de bTB étaient présents dans des régions très localisées et avec des génotypes spécifiques et persistants. Une des raisons de la persistance pourrait être également liée à la génétique de l'agent pathogène. Il est donc important de comprendre les déterminants du succès épidémiologique de ces génotypes persistants.

Différentes applications épidémiologiques et génomiques du séquençage massif de génome de *M. bovis* ont également été présentées. L'épidémiologie de terrain est très importante pour pouvoir déterminer les liens de transmission de *M. bovis* entre les animaux domestiques, les animaux de la faune sauvage et l'environnement. Ces liens sont compliqués à établir dans des régions partageant le même génotype (défini par le profil de spoligotypage et MLVA), comme c'est le cas pour les régions avec la plus forte prévalence de bTB en France. Le séquençage du génome entier et la recherche de SNP par rapport à un génome de référence permettent de réaliser des études épidémiologiques plus fines. Cependant, le génome de référence utilisé dans ces études est représentatif du complexe clonal Eu1 qui est très présent dans les îles britanniques, mais est peu présent en France et dans d'autres pays européens. D'autres génomes complets, plus proches des souches de terrain, sont donc nécessaires.

**Un premier objectif de cette thèse** est donc d'obtenir 10 nouveaux génomes complets représentatifs des clusters précédemment décrits (Hauer et al., 2019). La description et la comparaison de ces génomes permettront ainsi d'identifier les caractéristiques génétiques de chacun d'entre eux et de mieux définir les groupes auxquels les génomes appartiennent en proposant des listes de larges événements génétiques spécifiques. De plus, afin d'affiner nos connaissances génomiques de *M. bovis*, l'étude du pan-génome pourra être réalisée à l'aide de ces génomes complets, ce qui permettra d'éliminer les biais engendrés par l'utilisation de génomes fragmentés. Le séquençage complet de Mb3601, qui représente un des génotypes majoritairement retrouvés ces dernières années (SB0120-CO), a montré un nombre important de séquences d'insertion IS6110. Cette séquence joue un rôle important dans la plasticité du génome mycobactérien et pourrait aider la mycobactérie à s'adapter à un environnement hostile (Gonzalo-Asensio et al., 2018). Le génome de *M. bovis* est considéré comme ayant une ou très



peu de copies, au contraire de Mb3601 qui a 11 copies et est représentatif d'un génotype très prévalent ces dernières années.

**Un deuxième objectif** de ce travail est donc d'étudier le nombre d'IS6110 parmi les différentes souches françaises de *M. bovis* et l'implication génétique de leur position dans le génome. L'évolution du nombre et de la position des copies d'IS6110 est également étudiée dans les panels de souches de 3 génotypes majoritairement retrouvés en France afin d'évaluer si les modifications générées par ces insertions contribuent à leur adaptation et à leur succès épidémiologique.

### **3. Matériels et méthodes**

### **3.1. Panel de souches utilisées**

#### **3.1.1. Génomes représentant la diversité génétique de *M. bovis* en France**

Le premier panel (Panel 1) constitué de 87 souches de *M. bovis* isolées entre 1983 et 2011, représente la diversité française de *M. bovis* (Figure 19 et Annexe 1). Les souches proviennent de 81 bovins, de 2 sangliers, d'1 cerf, d'1 ovin, d'1 caprin et d'1 porc. Les génomes ont été obtenus par séquençage en utilisant la technologie Illumina Hiseq (Hauer et al., 2019). Lors de la comparaison avec les génomes complets obtenus dans cette étude, la souche A7 a été retirée du panel, car elle correspond au génome complet de la souche Mb1101 (voir partie 0. **3.1.3.**

**Les génomes complets**). Pour l'étude sur l'IS6110, un panel restreint de souches a été utilisé. Celui-ci exclut les souches (A8, D10, D8, F3, F7, H1 et H3) ayant moins de 10 SNP de différence avec une autre souche pour éviter des analyses redondantes.

#### **3.1.2. Génomes de souches sympatriques**

Afin d'étudier plus en détail les génotypes particulièrement retrouvés en France ces dernières années, 3 panels de souches de ces génotypes ont été également utilisés dans ce travail de thèse. Ces panels ont été obtenus dans le cadre d'études épidémiologiques.

##### **3.1.2.1. Génotype SB0120-CO**

Le deuxième panel (Panel 2) est constitué de 91 souches (dont le génome de référence Mb3601) de génotype SB0120-CO (SB0120 – 5 5 4 3 11 4 5 6) isolées en Côte d'Or entre 2009 et 2014 (Michelet et al., 2018). Les souches ont été isolées de 51 bovins (*Bos taurus*), 38 blaireaux (*Meles meles*), 2 sangliers (*Sus scrofa*) et 2 renards (*Vulpes vulpes*). Les génomes ont été séquencés en utilisant la technologie Illumina Hiseq (bases jumelées 2\*250 bp) à Genoscreen (Lille, France) à partir de lysats bactériens thermolysés sans étape de purification.

##### **3.1.2.2. Génotypes SB0821-F007 et SB0832-F015**

Le troisième panel (Panel 3) utilisé dans cette étude est constitué de 187 souches réparties en deux génotypes appartenant au Cluster A (43 souches de spoligotype SB0832 et de profil VNTR 6 5 5 3 11 2 4s 8 ainsi que de 144 souches de spoligotype SB0821 et de profil VNTR 4 5 5 3 11 2 5s 8). Elles ont été isolées dans les régions des Pyrénées-Atlantiques et des Landes entre 2002 et 2017 (Annexe 2) (Duault et al., 2022) à partir de 150 bovins (*Bos taurus*), 27 blaireaux (*Meles meles*), 8 sangliers (*Sus scrofa*), 1 porc et 1 humain. Les génomes ont été séquencés en utilisant la technologie Illumina Hiseq (bases jumelées 2\*150 bp) à l'ICM (Institut du cerveau et de la moelle épinière) (Paris, France) à partir lysats bactériens thermolysés sans étape de purification.

### **3.1.2.3 Génotype SB0120-DHV**

Le dernier panel (Panel 4) est constitué de 227 souches de génotype SB0120-DHV (SB0120 – 5 3 5 3 9 4 5 6) isolées en Dordogne et en Haute-Vienne entre 2001 et 2017 (Annexe 3). Les souches ont été isolées de 182 bovins (*Bos taurus*), 28 blaireaux (*Meles meles*), 11 sangliers (*Sus scrofa*), 3 renards (*Vulpes vulpes*), 2 cerfs (*Cervus elaphus*) et 1 chevreuil (*Capreolus capreolus*). Les génomes ont été obtenus de la même façon que pour les génomes du panel 3.

### **3.1.3. Les génomes complets**

Deux génomes complets sont également utilisés dans ce travail de thèse : AF2122/97 (LT708304.1), Mb3601 (NZ\_LR699570.1) dont les séquences sont disponibles sur Genbank (Branger et al., 2020; Garnier et al., 2003).

Les 10 souches à séquencer ont été sélectionnées afin de représenter tous les clusters préalablement décrits en France et en particulier les génotypes majoritaires circulant actuellement. Les caractéristiques des 10 souches sélectionnées sont décrites dans la Tableau 5.

- **Mb0486** (SB0821 / F007, 6 5 5 3 11 2 5s 4) et **Mb0531** (SB0826 / F005, 6 7 3 3 10 2 5s 8) correspondent respectivement à 17% et 3% des foyers génotypiques identifiés entre 2015 et 2017 (Michelet et al., 2020b). Ces deux génotypes font partie du Cluster A. Mb0486 est retrouvé dans les Pyrénées-Atlantiques (département 64), dans les Landes (40) et le Gers (32). **Mb0820** (SB0840 / F001, 7 5 5 3 8 2 5s 4) est représentatif d'un troisième génotype du Cluster A représentant 8% des souches identifiées entre 2015 et 2017 et est identifié en Corse (2A et 2B).

- **Mb2269** (SB0134 / GB35-09, 6 5 5 3 6 4 5 6) et **Mb3602** (SB0134 / GB35-14, 7 4 5 3 10 4 5 10) sont représentatifs de deux génotypes présents sur deux branches du Cluster C. Le génotype de Mb2269 est retrouvé en Ariège (09) et celui de Mb3602, dans la forêt de Brotonne (76). Mb3602 représente le génotype de la première souche française identifié dans la faune sauvage (Zanella et al., 2008).

- **Mb2487** (SB0999 / SB0999, 6 4 5 2 8 2 4 7) est un génotype du complexe clonal Eu2 retrouvé en Dordogne (24) et dans le Lot (46). Ce complexe clonal est également très présent dans la péninsule Ibérique (Rodriguez-Campos et al., 2012).

- **Mb2377** (SB0853 / F022, 3 6 5 2 9 3 4 6) est représentatif des souches du Cluster G qui ne sont plus retrouvées en France depuis 10 ans (dernier foyer découvert en 2012 due à F022, 3 6 5 2 9 3 4 6 SB0819) (Boschiroli et al., 2015; Michelet et al., 2020b).

- **Mb1855** (SB0120 / BCG-like, 5 3 5 3 9 4 5 6) est représentatif du génotype SB0120-DHV présent dans le complexe clonal Eu3, qui est le cluster le plus retrouvé en France. Ce génotype est le plus présent ces dernières années en France avec 35% des souches identifiées entre 2015 et 2017. De plus, il est endémique de la région Nouvelle Aquitaine et en particulier la Dordogne (24), la Haute-Vienne (87), la Charente (16), la Charente-Maritime (17) et la Gironde (33). Deux autres génotypes représentatifs du complexe clonal Eu3, sont sélectionnés. Le premier, **Mb3114** (SB0120 / BCG-like, 5 5 5 3 11 3 5 4), est représentatif d'un génotype autrefois très présent dans les Alpes et proches de ceux majoritairement retrouvés en Italie (Lombardi et al., 2017). Le deuxième est **Mb1101** (SB0120 / BCG, 5 2 3 3 10 3 3 10). Il s'agit d'une souche de terrain assez éloignée des autres souches du cluster, mais qui reste assez proche des souches vaccinales.

## **3.2. Obtention des génomes complets**

### **3.2.1. Obtention de l'ADN mycobactérien**

#### **3.2.1.1. Culture bactérienne**

Les génomes qui ont été séquencés dans cette étude proviennent de souches qui ont été préalablement isolées de bovins et d'un cerf (Tableau 5) avant d'être remises en culture par le LNR et conservées à -80°C dans des cryotubes. Pour chacune des souches, 200 µL de solution a été ajouté à 2 mL de Middlebrook 7H9 + ADC et mycobactine (Figure 21) afin de faciliter la remise en culture des souches. Pour toutes les étapes d'incubation, les tubes ont été conservés à l'incubateur à 37°C. Lorsque la solution était trouble, indiquant une concentration forte de bactéries dans la solution, 100 µL ont été étalés sur du milieu solide Middlebrook 7H10 + OADC. La croissance des bactéries sur le nouveau milieu permet l'apparition de colonies. Une seule colonie représentant un clone bactérien a été prélevée et ajoutée à 40 mL de Middlebrook 7H9 + ADC. Les tubes ont ensuite été laissés à l'incubateur pour permettre la croissance des bactéries jusqu'à obtenir une solution dense.

Tableau 5 : Présentation des 10 génomes de *Mycobacterium bovis* séquencés complètement dans ce travail de thèse.

Nom	Numéro d'analyse	Hôte	Département	Année d'isolement	Spoligotype	VNTR	Groupe de <i>M. bovis</i>
Mb0486	1994-08372-00	Bovin	64	1994	SB0821 / F007	6 5 5 3 11 2 5s 4	Cluster A
Mb0531	1994-12268-00	Bovin	64	1994	SB0826 / F005	6 7 3 3 10 2 5s 8	Cluster A
Mb0820	1997-05804-00	Bovin	20	1997	SB0840 / F001	7 5 5 3 8 2 5s 4	Cluster A
Mb2269	07-01791-01	Bovin	9	2007	SB0134 / GB35-09	6 5 5 3 6 4 5 6	Cluster C
Mb3602	01-01524-00	Cerf	76	2001	SB0134 / GB35-14	7 4 5 3 10 4 5 10	Cluster C
Mb2487	08-01322-00	Bovin	24	2008	SB0999 / SB0999	6 4 5 2 8 2 4 7	Complexe clonal Eu2
Mb2377	08-00705-00	Bovin	64	2008	SB0853 / F022	3 6 5 2 9 3 4 6	Cluster G
Mb1855	05-02950-00	Bovin	24	2005	SB0120 / BCG-like	5 3 5 3 9 4 5 6	Complexe clonal Eu3
Mb3114	D-11-01217	Bovin	74	2011	SB0120 / BCG-like	5 5 5 3 11 3 5 4	Complexe clonal Eu3
Mb1101	1999-04695-00	Bovin	59	1999	SB0120 / BCG-like	5 2 3 3 10 3 3 10	Complexe clonal Eu3

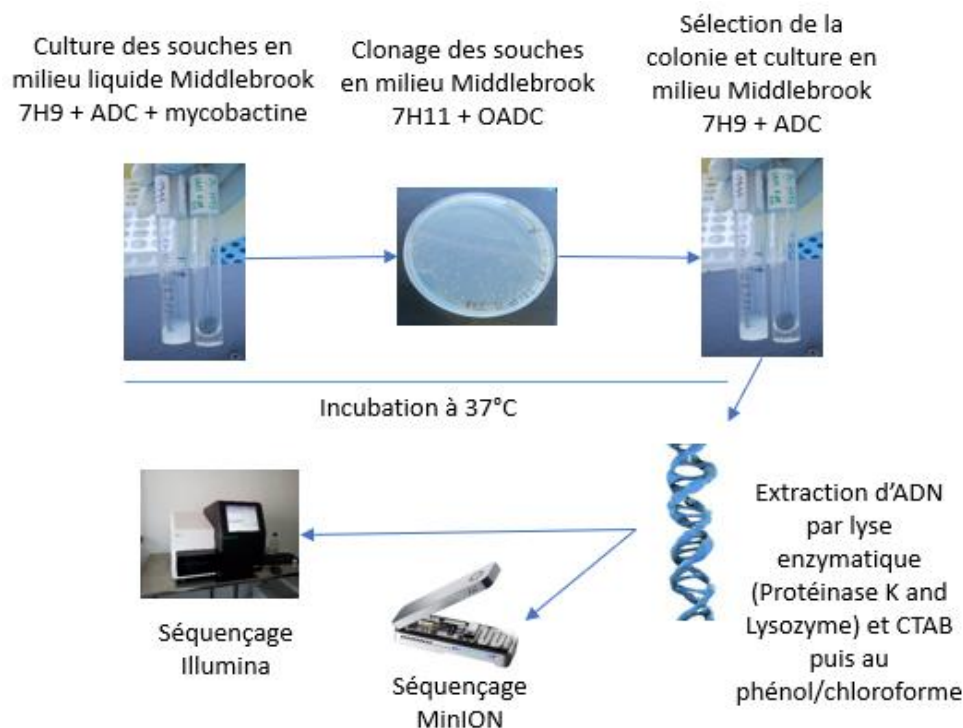


Figure 21 : Représentation schématique du protocole de culture bactérienne jusqu'à l'extraction d'ADN et son séquençage par les technologies Illumina et MinION.

### 3.2.1.2. Extraction d'ADN génomique

Les clones bactériens ont été inactivés 1h à 80°C. Le tube contenant la solution a été centrifugé, lavé une fois avec du tampon TE (tampon Tris-HCl à 10 mM + EDTA à 1 mM) et ensuite remis en suspension avec 1 mL de TE. Par la suite, 100 µL de 20 g/L de lysozyme ont été ajoutés et le tube a été incubé à 37°C pendant une nuit avec agitation (Figure 21). Enfin, 100 µL de 10% de SDS et 50 µL de protéinase K (Macherey-Nagel) ont été ajoutés et une incubation de 4 h à 56°C avec agitation régulière a été effectuée.

200 µL de TE contenant 10% de CTAB et du NaCl ont été ajoutés à la solution et incubés 1 h à 65°C. Après une centrifugation, le surnageant a été retiré et 200 µL de TE ont été ajoutés. La solution a été ensuite transférée dans un premier tube 5PRIME Phase Lock Gel Light de 2 mL (Quantabio). Un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (en proportion 25-24-1) a été ajouté puis la solution a été agitée vigoureusement. Après centrifugation, la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube 5PRIME Phase Lock Gel Light et l'étape de traitement avec solution organique répétée.

La phase aqueuse a ensuite été transférée dans un nouveau Eppendorf Tubes® où ont été ajoutés de l'acétate de sodium 3M et 1 µL de glycogène (20 g/L) pour faire précipiter l'ADN avec de

l'éthanol pur. La solution est ensuite centrifugée à 13 500 g à 4°C pendant 20min puis le surnageant a été soigneusement éliminé. Le culot a été repris dans 100 µL de TE, puis 1 µL de RNase A (10 g/L) a été ajouté et la solution a été incubée 30 min à 37°C afin d'éliminer l'ARN contaminant.

L'ADN a ensuite été lavé trois fois avec de l'éthanol 80% et des étapes de centrifugation, puis le culot a ensuite été remis en suspension avec du Tris HCl 10 mM et a été laissé trois à quatre jours à 4°C avant de procéder au test de qualité de l'ADN et à sa quantification.

### **3.2.1.3. Contrôle qualité de l'ADN**

La quantité et la qualité des produits d'extraction ont été évaluées par deux méthodes : avec le Qubit™ (Qubit 2.0 Fluorometer de Thermo Fisher Scientific) et avec le TapeStation (Agilent). En plus de cela, pour le séquençage Illumina, la plateforme Genoscreen (Lille, France) a effectué un test SybrGreen (Thermofisher scientific) et par électrophorèse sur gel d'agarose afin de valider la qualité et la quantité d'ADN dans les échantillons envoyés.

## **3.2.2. Séquençage des génomes**

### **3.2.2.1. Le séquençage Illumina**

Le séquençage Illumina Miseq a été effectué par la plateforme de Genoscreen (Lille, France) en 2\*150 paires de bases. Afin de ne pas surreprésenter certains fragments lors de la préparation de la bibliothèque, les fichiers fastq présents en paires ont été filtrés des séquences répliquées. Cela permet de ne garder qu'une seule paire de séquences pour chaque ensemble de paires de séquences répliquées.

### **3.2.2.2. Le séquençage MinION**

Le séquençage MinION a été réalisé après une purification des échantillons sur billes AMPure XP en suivant le protocole « Agencourt AMPure XP » de Beckman Coulter. Les échantillons ont été ajustés à une concentration de 2 µg pour 50 µL.

La préparation des échantillons a ensuite été réalisée à l'aide du protocole de Nanopore "Native barcoding genomic DNA (with EXP-NBD104, EXP-NBD114 and SQK-LSK109)" (Version : NBE\_9065\_v109\_revV\_14Aug2019). La banque d'ADN final de 324 ng a été chargée sur une cellule de flux (R9.4.1) et a été séquencée avec le séquenceur Oxford Nanopore MinION pendant 48h.



### 3.2.3. Assemblage des génomes

#### 3.2.3.1. Contrôle qualité

Les données de séquençage Illumina ont été reçues de Genoscreen en format fastq.gz. Pour les données de séquençage MinION il a été effectué un appel de bases, permettant de transcrire les courants électriques en bases. Un démultiplexage a également été effectué, permettant d'isoler les différentes séquences des échantillons présents dans la bibliothèque qui ont été chargés sur la cellule de flux. Le premier traitement a permis de donner des fichiers en format fastq.gz comme pour les données de séquençage Illumina.

La qualité du séquençage a ensuite été évaluée (Figure 22) avec l'outil FastQC (Version 0.11.9) (Wingett and Andrews, 2018). Les séquences provenant des données de séquençage Illumina ont été filtrées et les séquences ayant une qualité insuffisante (limite de Q20) ont été retirées avec l'outil Sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>) (Guimaraes and Zimpel, 2020; Gurevich et al., 2013; Wang et al., 2021; Wick and Holt, 2021). Les séquences provenant des données de séquençage MinION ont été filtrées avec l'outil Nanoflit (version 1.1.0). Des séquences de mauvaise qualité ou trop courtes (limite de Q8 et 500pb) ont ainsi pu être retirées (Loman et al., 2015).

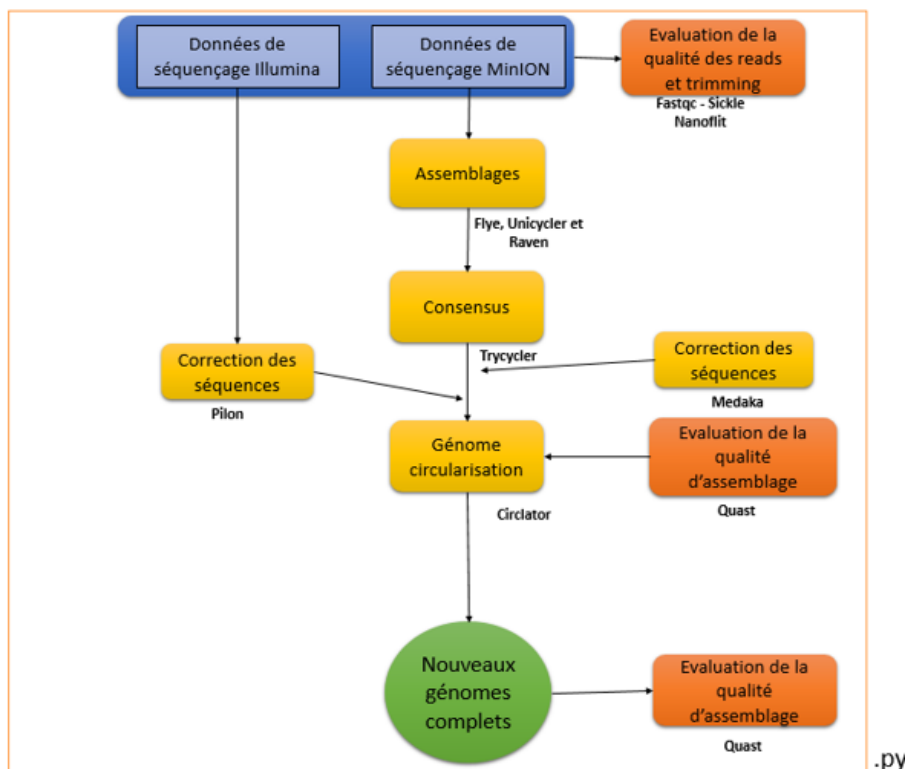


Figure 22 : Représentation schématique de la stratégie d'assemblage *de novo* des génomes complets en partant des données de séquençage de technologies Illumina et MinION (en bleu) et en allant jusqu'aux génomes finaux (en vert) en mentionnant les différents outils utilisés et étapes d'évaluation de la qualité (en orange). Cette stratégie a été semi-automatisée (représenté par le « .py » en bas à droite de la figure).

### **3.2.3.2. Assemblage de novo**

Durant ce travail de thèse, plusieurs stratégies pour assembler des génomes de *M. bovis* complets ont été comparées afin de concevoir la stratégie utilisée et présentée dans ce manuscrit (Figure 22). Cette stratégie a été semi-automatisée et est disponible sur github [https://github.com/CiriacC/Hybrid\\_bacterial\\_genome\\_assembly](https://github.com/CiriacC/Hybrid_bacterial_genome_assembly) (Figure 22).

La séparation en 12 parties des données de séquençage MinION est réalisée avec l'outil Trycycler --subsample (version v0.5.0) (Wick et al., 2021). Les données générées ont ensuite été assemblées 4 fois à l'aide de trois assembleurs : Flye (version 2.8.3-b 1695) (Kolmogorov et al., 2020), Raven (version 1.50) (Vaser et al., 2020) et Unicycler (version v0.4.9b) (Wick et al., 2017). Le consensus des assemblages a ensuite été déterminé avec l'outil Trycycler (version v0.5.0) (Wick et al., 2021). L'assemblage consensus a été poli avec l'outil Medaka (version 1.4.3, <https://github.com/nanoporetech/medaka>) qui permet de créer un consensus entre les données de séquençage MinION et l'assemblage obtenu avec Trycycler. Afin de corriger les erreurs de séquençage MinION, les données de séquençage Illumina qui comportent moins d'erreurs ont été utilisées avec l'outil Pilon (version 1.24) (Walker et al., 2014). Cet outil est utilisé plusieurs fois pour ne plus avoir de corrections à faire entre l'assemblage et les données de séquençage Illumina. La circularisation finale et l'orientation du génome avec l'utilisation du gène *dnaA* comme position de départ (l'option --min\_id 70 a été utilisée), ont été réalisées à l'aide de l'outil Circlator (version 1.5.5) (Hunt et al., 2015).

### **3.2.3.3. L'assemblage de génomes avec des données de séquençage de seconde génération**

Les données de séquençage des génomes séquencés uniquement avec la technologie Illumina ont été analysées et filtrées comme cela a été présenté précédemment. Les données ont ensuite pu être assemblées en utilisant l'outil Spades (version 3.13.1) avec l'option --careful qui permet de réduire le nombre de courts indels et les mésappariements (Bankevich et al., 2012).

### **3.2.3.4. Caractéristiques générales et annotation de génomes**

Les statistiques d'assemblage ont été évaluées avec l'outil Quast (version 5.0.2) (Gurevich et al., 2013) (Figure 22) permettant d'indiquer, entre autres, le nombre de contigs, le %GC, la taille du génome, le nombre d'ARNt (Acide ribonucléique de transfert) ou encore ARNr (Acide ribonucléique ribosomique). L'annotation des génomes a été réalisée avec l'outil Prokka (version 1.14.6) (Seemann, 2014) avec l'option --prodigaltf permettant d'entraîner l'outil à

annoter en utilisant un génome de référence, Mb3601 dans ce travail (d'autres options ont été utilisées comme --force, -- protein avec un génome de référence en format genbank et --prefix).

### **3.3. Analyses bio-informatiques**

#### **3.3.1. L'analyse pan-génomique**

L'analyse pan-génomique permet de donner des informations sur la diversité génomique de *M. bovis* en étudiant les gènes de bases (« *core gene* » en anglais) et accessoires (« *accessory gene* » en anglais) d'un panel de génomes. Cela peut être important pour observer pour connaître l'évolution du pan-génome et les possibles adaptations de certains groupes. L'analyse pan-génomique a été réalisée avec Panaroo (version 1.2.8) (Tonkin-Hill et al., 2020). L'outil a été utilisé en mode strict (option --clean-mode strict) ainsi qu'avec l'option --merge\_parlogus. L'outil IQ-Tree (v 1.6.9) (Nguyen et al., 2015) a été utilisé pour inférer l'arbre phylogénétique avec 100 bootstraps pseudo-répliqués. La sélection du modèle d'évolution le mieux adapté a été effectuée dans IQ-Tree sur la base du critère d'information bayésien le plus bas. La carte thermique permettant la visualisation graphique de la présence et l'absence de gènes a été réalisée avec le script roary\_plot.py du pipeline Roary (Page et al., 2015).

L'évaluation et la visualisation du pan génomique, du génome de base et du nombre de nouveaux gènes en fonction du nombre de génomes utilisés ont été réalisées avec un fichier de sortie de Panaroo nommé « gene\_presence\_absence.Rtab » et l'outil PanGP (Zhao et al., 2014). Cet outil a été utilisé avec les options « Distance guide », taille de 500 échantillons, répétition de 100 échantillons et avec un coefficient d'amplification de 100.

#### **3.3.2. Identification des SNP**

La recherche de SNP permet également de connaître la variabilité génétique de *M. bovis*. Les données provenant de cette analyse peuvent par exemple être utiles pour classer les différentes souches dans un arbre phylogénétique. L'analyse SNP a été réalisée de deux façons :

- La première avec le module wgSNP du logiciel Bionumerics (version 7.6, AppliedMath, Belgique) en utilisant les critères stricts suivants : le SNP était soutenu par la présence minimum de cinq séquences de sens inverse et cinq séquences de sens avant ; 10 bases devaient séparer chaque SNP ; les SNP n'étaient pas dans des régions répétées du génome ; certains SNP n'étaient pas non plus inclus comme les SNP ambigus avec au moins une base non fiable (« N ») dans un des génomes, une délétion ou une base ambiguë (qui n'est pas A, T, C ou G) présente dans au moins un des génomes.

- La deuxième méthode par utilisation d'un script automatisé. Le script a d'abord aligné sur le génome de référence Mb3601, les séquences de lecture provenant des données de séquençage Illumina en utilisant samtools et BWA (Li et al., 2009; Li and Faucher, 2017). Les fichiers vcf ont ensuite été produits en utilisant bcftools mpileup et Mb3601. La recherche des SNP a ensuite été faite avec bcftools call (avec l'option --vm) (Danecek et al., 2021). Les données produites ont été filtrées en utilisant vcffilter et les options -f QUAL > 150 -f DP > 20 -f MQ > 49. Tous les SNP détectés précédemment ont été utilisés pour lister toutes les positions de variants du panel afin de pouvoir faire un second appel (en utilisant bcftools mpileup puis bcftools call avec l'option -m) uniquement sur ces positions pour avoir les mêmes informations pour toutes les souches et faciliter la fusion des vcf avec bcftools merge. L'annotation des SNP et la prédiction de la conséquence génétique du SNP ont été réalisées en utilisant SnpEff et le génome de référence Mb3601. La sélection des SNP a été effectuée dans un deuxième temps en utilisant les variants filtrés, Mb3601 et bcftools mpileup puis bcftools call (avec l'option -m). Les fichiers vcf ont ensuite été fusionnés avec bcftools merge. L'annotation des SNP et la prédiction de la conséquence génétique du SNP ont été réalisées en utilisant SnpEff et le génome de référence Mb3601. Les étapes finales de la sélection des variants ont été réalisées avec les outils vcflib vcfnsps, vcflib vcfvup, vcflib vcfnumalt et vcffilter (option -f 'NUMALT = 1') (Garrison et al., 2022). Les SNP qui étaient soutenus par moins de cinq séquences de sens inverse et cinq séquences de sens avant ont été filtrés. Les SNP séparés par moins de 10 bases ont également été retirés. Les SNP non fiables, indels et les SNP avec des bases ambiguës avec au moins une base non fiable (« N ») dans un des génomes ont également été filtrés. Les SNP présents dans les protéines de la famille PE/PPE et *pks12* ont également été supprimés en raison de la faible confiance et du taux d'erreur plus élevé de ces régions, en accord avec de précédents travaux (Lorente-Leal et al., 2021; Marin et al., 2021; Meehan et al., 2019).

### **3.3.3. Analyses phylogénétiques**

La construction des arbres phylogénétiques a été réalisée de deux façons différentes :

- Une première méthode a été appliquée pour les listes de SNP produits avec Bionumerics. Les arbres phylogénétiques se basant sur ces listes ont été dessinés en utilisant Bionumerics et la méthode de maximum de parcimonie.
- Une deuxième approche a utilisé Mega (Kumar et al., 2016) et la méthode de maximum de vraisemblance (modèle Hasegawa-Kishino-Yano) pour construire les arbres phylogénétiques basés sur les SNP. Le traitement des fichiers de sortie de Mega a été réalisé avec iTOL (version 6.5.6) (<https://itol.embl.de/>) (Letunic and Bork, 2007).

### **3.3.4. La recherche de différences génomiques structurales**

#### **3.3.4.1. La recherche d'indel**

L'organisation génomique structurale a été observée avec le logiciel progressiveMauve (version 2.4.0) (Darling et al., 2011) en utilisant les fichiers fasta obtenus après assemblage ou les fichiers gbk obtenus après annotation des génomes avec l'outil Prokka. Le logiciel a permis de comparer la structure des génomes entre eux en les alignant pour y identifier des insertions ou délétions. L'annotation des indels a été réalisée en se basant sur le génome de référence utilisé dans la recherche des SNP. La comparaison des indels avec ceux déjà connus a été effectuée en se basant sur les travaux de Bespiatykh (Bespiatykh et al., 2021). La stratégie de recherche d'indels a été validée par amplification de séquences cibles (présentées dans la partie 0.

	Longueur	Séquence (5'→3')	TM (°C)	Information	Taille de l'amplicon (bp)
IS6110-1-F	18	TGAACCGCCCCGGCATGT	60,5	partie 3' de l'IS6110	695
IS6110-1-R	18	CCCGGACAGGCCGAGTTT	60,5		
IS6110-2-F	18	CAGATGCACCGTCGAACG	58,2	partie 5' de l'IS6110	706
IS6110-2-R	18	TGAACCGCCCCGGTGAGT	60,5		
IS6110-F9-F	18	CCCGGGTCCATGCGGTTT	60,5	partie 3' de l'IS6110 du Cluster G (fonctionne avec IS6110-2-R)	1 016
RDmbovis1-Cluster1-F	20	CCTGTTCAAGGGCAGTTTCG	59,4	Délétion partielle de <i>VapB46</i>	1 092 ou 1 750
RDmbovis1-Cluster1-R	20	GCTGCTTGAGTCGGGCATTA	59,4		
RDmbovis2-la1.2-F	22	TGCAAGAGATGGCTGAGGAGT T	60,3	Délétion partielle du gène <i>hspR</i>	352 ou 250

**3.4.2.2. La PCR en point final**) et migration du produit PCR sur gel d'agarose.

#### **3.3.4.2. Les catégories de fonction de gènes**

La recherche de mutations ou délétions qui peuvent être présentes dans les ORF a permis d'isoler plusieurs gènes. L'analyse de l'ontologie génétique a été faite avec l'annotation fonctionnelle de ces gènes en utilisant l'outil eggNOG 5.0 (Huerta-Cepas et al., 2019). Cette analyse a permis de répartir les gènes en catégories fonctionnelles de clusters de gènes orthologues (COG).

#### **3.3.4.3. Assemblage de la région CRISPR-Cas**

Comme cela a été vu dans la partie introductive, la région CRISPR-Cas est une région polymorphique ciblée par le spoligotypage pour typer les membres du MTBC. La construction de la région CRISPR-Cas a été réalisée à partir des fichiers SRA des génomes ainsi qu'en

utilisant les outils tbannotator (<https://github.com/cguyeux/TB-tools>) et CRISPRbuilder-TB (<https://github.com/cguyeux/CRISPRbuilder-TB>) (Guyeux et al., 2021). Il s'agit de méthodes automatisées de construction de contigs utilisant l'approche De Bruijn qui est capable de reconstruire la région CRISPR-Cas. Cette reconstruction a permis d'observer la présence ou non des gènes *cas* et des spacers.

Pour une analyse approfondie, les génomes assemblés ont été utilisés pour rechercher les contigs contenant la séquence DR et CRISPR-Cas avec l'alignement blast (Altschul et al., 1997). L'annotation des spacers a été faite selon l'étude de Van der Zanden (van der Zanden et al., 2002).

### **3.4. Recherche de la séquence d'insertion IS6110**

#### **3.4.1. ISMapper**

La recherche de séquence d'insertion dans des génomes fragmentés a été effectuée avec l'outil ISMapper (Version 2.0.1) (Hawkey et al., 2015). Pour obtenir la détection de la séquence avec un niveau de confiance élevé, les profondeurs de lecture moyennes à l'échelle du génome de moins de  $75 \times$  ont été exclues lors de la sélection des souches du panel 2, 3 et 4.

Dans un premier temps, l'outil a identifié les séquences correspondant à une séquence cible à l'aide de BWA (Li and Durbin, 2009) (Figure 23). Ces séquences ont été sélectionnées à l'aide de samtools et réparties dans deux groupes selon celles correspondant à la partie 3' de la séquence d'intérêt ou 5' avant d'être ré alignées sur un génome de référence (Li et al., 2009). Pour chaque position la profondeur est déterminée avec bedtools pour sélectionner les positions où la profondeur de lecture est suffisante (au-dessus de 6) (Quinlan and Hall, 2010). Si deux positions (correspondant au 3' et au 5' de la séquence d'intérêt) sont distantes de plus ou moins 15 bp, cela indique une nouvelle position de la séquence d'intérêt. Si la distance correspond à la taille de la séquence recherchée, alors cela indique que la position est probablement présente dans le génome de référence.

Afin de réduire les incertitudes et valider/invalider certaines positions, une vérification des sites incertains a été réalisée en utilisant les fichiers bam générés par ISMapper et en les observant avec l'outil IGV (Integrative Genomics Viewer) (Robinson et al., 2017, 2011b; Thorvaldsdóttir et al., 2013). L'orientation de la séquence d'intérêt (en sens avant ou sens arrière) ainsi que la présence des gènes aux abords des positions déterminées pourront être également déterminées par ISMapper (Figure 23).

La recherche de séquence d'intérêt dans un génome complet peut être retrouvée par blast ou à l'aide de l'outil Bionumerics (Altschul et al., 1997).

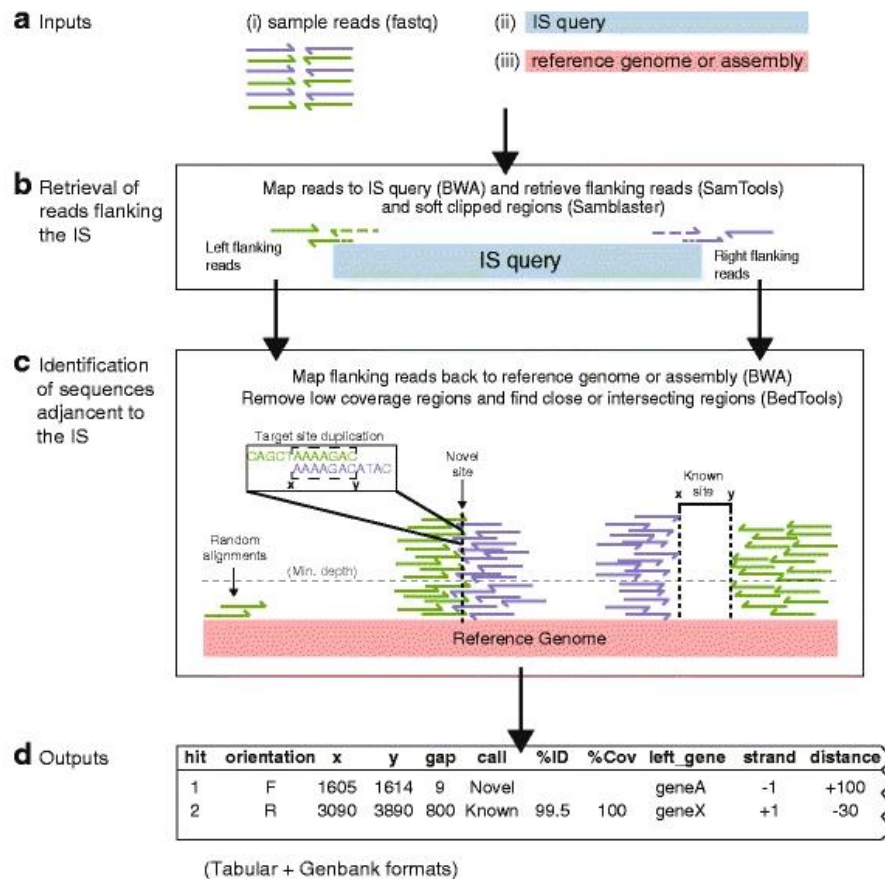


Figure 23 : Représentation schématique de la recherche de séquences d'insertion faite par ISMapper. Les séquences sont alignées sur la séquence d'intérêt afin de sélectionner les séquences s'alignant sur la séquence d'intérêt (b). Les séquences sélectionnées sont ensuite alignées sur un génome de référence afin de déterminer leur position sur le génome et donc la position de la séquence d'intérêt (c) (Hawkey et al., 2015).

### **3.4.2. Confirmation de résultats *in silico* par l'amplification et le séquençage de séquence d'intérêt**

Afin de confirmer la présence de l'IS6110 dans certaines souches, mais aussi de confirmer la délétion partielle ou les mutations présentes sur cette séquence, une recherche spécifique par amplification de la séquence et un séquençage Sanger ont été réalisés.

#### **3.4.2.1. Conception d'amorces**

La recherche de séquences cibles dans un génome a été faite avec le logiciel Bionumerics en utilisant les génomes déjà disponibles dans la littérature ou les génomes séquencés durant ce travail de thèse. Des amorces spécifiques encadrant la séquence d'intérêt ont ensuite été conçues



à l'aide du site internet d'Eurofins Genomics (Nantes, France). La liste des amorces conçues au cours de ce projet de thèse est disponible dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Listes des amorces conçues et utilisées dans ce travail de thèse. A l'extrémité du nom, F indique une amorce sens et R une amorce dans le sens inverse.

	Longueur	Séquence (5'→3')	TM (°C)	Information	Taille de l'amplicon (bp)
IS6110-1-F	18	TGAACCGCCCGGCATGT	60,5	partie 3' de l'IS6110	695
IS6110-1-R	18	CCCGGACAGGCCGAGTTT	60,5		
IS6110-2-F	18	CAGATGCACCGTCGAACG	58,2	partie 5' de l'IS6110	706
IS6110-2-R	18	TGAACCGCCCGGTGAGT	60,5		
IS6110-F9-F	18	CCCGGGTCCATGCGGTTT	60,5	partie 3' de l'IS6110 du Cluster G (fonctionne avec IS6110-2-R)	1 016
RDmbovis1-Cluster1-F	20	CCTGTTCAAGGGCAGTTTCG	59,4	Délétion partielle de <i>VapB46</i>	1 092 ou 1 750
RDmbovis1-Cluster1-R	20	GCTGCTTGAGTCGGCATT	59,4		
RDmbovis2-la1.2-F	22	TGCAAGAGATGGCTGAGGAGT T	60,3	Délétion partielle du gène <i>hspR</i>	352 ou 250

#### **3.4.2.2. La PCR en point final**

Un volume de 20 µL d'une solution aqueuse a été utilisé pour pouvoir amplifier une séquence spécifique par PCR. Cette solution a été réalisée à partir de 1 µM de chaque amorce (R et F pour un couple donné), de 2,5 µL de tampon d'amplification (HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)), de 5 µL de tampon Q (HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)), de 0,2 µM de Set Dntp (Promega) et d'une unité de Taq polymérase (HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)). Ensuite, 5 µL d'ADN ont été ajoutés à la solution. Le cycle PCR était constitué d'une première phase de 15min à 94°C puis de 4 cycles de 30s à 94°C suivis de 45s à 65°C (pouvant varier selon les amorces utilisées) et de 3min à 72°C. Le cycle PCR a ensuite réalisé 44 cycles de 30s à 94 °C, de 45s à 60°C et d'1min30 (pouvant varier selon la longueur de la séquence ciblée) à 72°C. Le cycle PCR se terminait par une élongation finale de 10min à 72°C. Le produit PCR a été ensuite observable à l'aide d'une migration sur gel d'agarose.

#### **3.4.2.3. Le séquençage Sanger**

Un produit PCR pouvait ensuite être envoyé à Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne) afin d'être séquençé avec la technologie Sanger. Le résultat du séquençage était ensuite analysé avec l'outil BioEdit (RRID:SCR\_007361) (Frolov et al., 1997).



## **4. Séquençage de nouveaux génomes complets**

Ce travail a fait l'objet de :

Trois posters :

**C Charles**, L Michelet, F Vorimore, T Cochard, F Biet, M L Boschioli. New reference genomes of *Mycobacterium bovis* adapted to French genotype diversity. Annual Scientific Meeting One Health European Joint Programme 2021. Copenhagen, Danemark

**C Charles**, L Michelet, F Vorimore, T Cochard, F Biet, M L Boschioli. New *Mycobacterium bovis* complete genomes of different clonal complexes to improve molecular epidemiology of french field strains. Annual Scientific Meeting One Health European Joint Programme 2022. Oriveto, Italie.

**C Charles**, L Michelet, F Vorimore, T Cochard, F Biet, M L Boschioli. New reference genomes of *Mycobacterium bovis* adapted to French genotype diversity. Congrès *M. bovis* 2022. Galway, Irlande.

Deux communications orales :

**C Charles**. New *Mycobacterium bovis* complete genomes of different clonal complexes to improve molecular epidemiology studies of French field strains. ABIES Days 2022. Paris, France.

**C Charles**. New *Mycobacterium bovis* complete genomes of different clonal complexes to improve molecular epidemiology studies of French field strains. Journée Scientifique et Doctorale de l'ANSES 2022. Maisons-Alfort, France. Prix de la meilleure présentation.

Une publication :

**C Charles**, C Conde, F Vorimore, L Michelet, F M L Boschioli. and F. Biet. 2022. Feature of ten *Mycobacterium bovis* complete genomes of 5 different lineages. *Microorganisms* vol. 11,1 177. 11 Jan. 2023, doi:10.3390/microorganisms11010177.

Les récentes avancées dans les technologies de séquençage ont permis d'améliorer de façon très importante la compréhension de l'épidémiologie de la tuberculose notamment dans les liens de transmission entre les bovins et la faune sauvage qui permettent le maintien de la tuberculose dans certaines régions (Akhmetova et al., 2021; Duault et al., 2022; Price-Carter et al., 2018; R.r et al., 2016). Comme cela a été présenté dans la partie introductive, le WGS a permis d'améliorer considérablement les analyses phylogénomiques de la distribution des génomes de *M. bovis* dans le monde (Zimpel et al., 2020). L'utilisation du génome de référence AF2122/97

(Garnier et al., 2003) est adaptée pour l'étude des souches du complexe clonal Eu1, qui sont largement représentées dans les études de WGS (Zimpel et al., 2020). Néanmoins, d'autres génomes complets sont nécessaires afin d'avoir des références plus proches des souches de terrain des pays où le complexe clonal Eu1 n'est pas majoritaire.

En effet, comme cela a été décrit précédemment, Eu3 est le complexe clonal majoritaire en France et en Italie tandis que Eu2 l'est pour l'Espagne et le Portugal (Figure 18) (Branger et al., 2020; Delavenne et al., 2020; Michelet et al., 2020b; Rodriguez-Campos et al., 2014, 2012). L'obtention de nouveaux génomes de référence est donc cruciale pour ces pays pour améliorer l'épidémiologie de terrain (Guimaraes and Zimpel, 2020). Ils pourraient également permettre de mieux décrire les clusters de *M. bovis* précédemment décrits en permettant l'étude de polymorphismes spécifiques qui ne sont pas retrouvés dans l'étude des génomes fragmentés.

Un autre génome complet, Mb3601, a été récemment obtenu en combinant les technologies de séquençage à lecture courte (Illumina) et à lecture longue (PacBio) (Branger et al., 2020). Ce nouveau génome est spécifique d'un des génotypes les plus répandus en France ces dernières années, SB0120-CO (Boschiroli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Hauer et al., 2015). L'étude de ce génome complet a mis en évidence la présence d'un nombre important de copies d'IS6110 et la présence de plusieurs indels dans son génome.

L'analyse et la description des génomes complets représentatifs des génotypes les plus persistants en France permettront donc d'améliorer également nos connaissances sur ces derniers et peut-être de comprendre des déterminants de leur succès épidémiologique.

L'objectif de cette première partie de résultat est donc l'obtention et la description de 10 nouveaux génomes complets qui représentent les lignées de *M. bovis* identifiées en France, et qui ont été sélectionnés parmi les principaux génotypes responsables de la bTB ces dernières années. Ces génomes permettront d'affiner nos connaissances génomiques de *M. bovis* à l'aide de l'analyse du pan-génome et de fournir une meilleure résolution de la phylogénie nécessaire à l'étude de l'épidémiologie, de la transmission et de l'évolution de cet agent pathogène clonal.

#### **4.1. Travaux publiés dans Microorganisms.**



## Article

# Features of *Mycobacterium bovis* Complete Genomes Belonging to 5 Different Lineages

Ciriac Charles <sup>1,2</sup>, Cyril Conde <sup>2</sup>, Fabien Vorimore <sup>3</sup>, Thierry Cochard <sup>2</sup>, Lorraine Michelet <sup>1</sup>, Maria Laura Boschioli <sup>1,\*</sup> and Franck Biet <sup>2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Animal Health Laboratory, National Reference Laboratory for Tuberculosis, Paris-Est University, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), CEDEX, 94701 Maisons-Alfort, France; ciriac.charles11@gmail.com (C.C.); lorraine.michelet@anses.fr (L.M.)
- <sup>2</sup> Infectiologie et Santé Publique (ISP), Institut National de Recherche pour L'agriculture, L'alimentation et L'environnement (INRAE), Université de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly, France; cyril.conde@inrae.fr (C.C.); thierry.cochard@inrae.fr (T.C.)
- <sup>3</sup> Laboratory for Food Safety, Unit of 'Pathogenic *E. coli*' (COLiPATH) & Genomics Platform 'IdentyPath' (IDPA), ANSES, 94701 Maisons-Alfort, France; fabien.vorimore@anses.fr
- \* Correspondence: maria-laura.boschioli@anses.fr (M.L.B.); franck.biet@inrae.fr (F.B.); Tel.: +33-149771321 (M.L.B.); +33-247427869 (F.B.)

**Abstract:** Mammalian tuberculosis (TB) is a zoonotic disease mainly due to *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). A current challenge for its eradication is understanding its transmission within multi-host systems. Improvements in long-read sequencing technologies have made it possible to obtain complete bacterial genomes that provide a comprehensive view of species-specific genomic features. In the context of TB, new genomic references based on complete genomes genetically close to field strains are also essential to perform precise field molecular epidemiological studies. A total of 10 *M. bovis* strains representing each genetic lineage identified in France and in other countries were selected for performing complete assembly of their genomes. Pangenome analysis revealed a "closed" pangenome composed of 3900 core genes and only 96 accessory genes. Whole genomes-based alignment using progressive Mauve showed remarkable conservation of the genomic synteny except that the genomes have a variable number of copies of *IS6110*. Characteristic genomic traits of each lineage were identified through the discovery of specific indels. Altogether, these results provide new genetic features that improve the description of *M. bovis* lineages. The availability of new complete representative genomes of *M. bovis* will be useful to epidemiological studies and better understand the transmission of this clonal-evolving pathogen.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*; mammalian tuberculosis (TB); complete de novo assembly; transmission; pangenome



**Citation:** Charles, C.; Conde, C.; Vorimore, F.; Cochard, T.; Michelet, L.; Boschioli, M.L.; Biet, F. Features of *Mycobacterium bovis* Complete Genomes Belonging to 5 Different Lineages. *Microorganisms* **2023**, *11*, 177. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010177>

Academic Editors: Guislaine Réfrégier and Charlotte Genestet

Received: 25 November 2022

Revised: 6 January 2023

Accepted: 7 January 2023

Published: 11 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Mammalian tuberculosis (TB) is a zoonotic disease mainly due to *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Within *M. bovis*, four major clonal complexes were defined by the lack of certain specific regions, single nucleotide polymorphism (SNP), and genetics signatures in the DR region [1–4]. These four groups are the European 1 clonal complex (Eu1) mainly present in the British Islands, and the former British empire colonies [4], the European 2 clonal complex (Eu2), dominant in the Iberian Peninsula [3], the African 1 clonal complex (Af1) present in Mali, Cameroon, Nigeria and Chad [2], and the African 2 clonal complex (Af2) mostly found in East Africa [1].

The generalization of genome sequencing in the last years has made it possible to obtain several thousands of short-reads whole genome sequences of *M. bovis* [5–10]. These data are useful to propose *M. bovis* classification [7,10,11], such as that of Zwyrer et al. proposing to classify this species into eight sublineages named La1.1 to La1.8 [11]. The

*M. bovis* French diversity has been divided into nine clusters (Cluster A to I, cluster D represents Eu1 and cluster F represents Eu2), which have been defined by specific SNPs, particular signatures in the DR region and in certain VNTR loci [7]. Strains belonging to cluster A, cluster I, and cluster C provoked the majority of outbreaks detected in France in the last 20 years [7,12–14]. New complete genomes belonging to these different groups could help improve the description of *M. bovis* clusters defined previously. Indeed, most sequenced genomes are drafts. These genomes are incomplete and contain indels which can bias genetic structure studies or pangenomic studies [15]. Genome sequencing using long-read technologies now makes it possible to correct these errors and complete the genome at a lower cost [16].

Until recently, only AF2122/97 (NC\_002945.4), the complete genome of a Eu1 field strain isolated in the UK, was used as a reference in whole genome SNP (wgSNP) studies [17,18]. Even though this reference genome is well adapted for epidemiological studies where Eu1 strains are common [11,19–23], it could be less fitted for studies in France and other mainland European countries where strains belonging to this clonal complex are not frequent [3]. Recently, a new complete genome, Mb3601, has been published [24]. Mb3601 was obtained by combining short-reads (Illumina) and long-read (PacBio) sequencing technologies. This new genome is specific to one of the most widespread genotypes in France in the last years, SB0120-CO [25]. The study of this complete genome has highlighted the presence of a significant number of IS6110 copies and the presence of several indels in its genome. Its description led to the proposal of a new clonal complex, European 3, to replace Cluster I.

The aim of this work was to obtain new complete genomes that represent *M. bovis* lineages identified in France selected among the main genotypes responsible for TB in the last years to refine our genomic knowledge of *M. bovis* via pangenome analysis and to provide better resolution of the phylogeny needed to study the epidemiology, transmission, and evolution of this clonal pathogen.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *Mycobacterium bovis* Strains

A total of 10 strains that cover all *M. bovis* lineages identified in France and representing the main genotypes responsible for TB outbreaks were selected from the National reference laboratory strain collection (Table 1). These strains were grown in Middlebrook 7H9 + ADC enrichment supplement as described previously [7].

### 2.2. Additional Genomes

To improve pangenomic and SNP studies, 86 genomes representative of the *M. bovis* French diversity obtained by Illumina technology in a previous study [7] and 2 complete genomes (Mb3601 and AF2122/97) were included [18,24].

### 2.3. DNA Extraction

DNA extraction was performed on 40 mL of stationary phase culture using CTAB and phenol chloroform [7,26,27]. DNA concentration was measured with Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI, Italy) using the “dsDNA BR Assay” kit (Thermo Fisher Scientific). For MinION sequencing, DNA qualities were checked with Nanodrop and DNA integrity was checked with an Agilent 4200 TapeStation. For Illumina sequencing, control quality was performed by Genoscreen (Lille, France) by SybrGreen assay (ThermoFisher scientific) and qualitatively controlled by agarose gel electrophoresis.

**Table 1.** Information on the 10 *M. bovis* strains selected and sequenced in this study.

Name	Mb2487	Mb3602	Mb2269	Mb0820	Mb0531	Mb0486	Mb2377	Mb1101	Mb1855	Mb3114
Accession Number	CP096839	CP096843	CP096840	CP096841	CP096847	CP096848	CP096846	CP096845	CP096844	CP096842
Host species	Cattle	Deer	Cattle	Cattle	Cattle	Cattle	Cattle	Cattle	Cattle	Cattle
Spoligotype ID	SB0999	SB0134	SB0134	SB0840	SB0826	SB0821	SB0853	SB0120	SB0120	SB0120
MLVA profile *	6 4 5 2 8 2 4 7	7 4 5 3 10 4 5 10	6 5 5 3 6 4 5 6	7 5 5 3 8 2 5 s 4	6 7 3 3 10 2 5 s 8	6 5 5 3 11 2 5 s 4	3 6 5 2 9 3 4 6	5 2 3 3 10 3 3 10	5 3 5 3 9 4 5 6	5 5 5 3 11 3 5 4
Cluster	F	C	C	A	A	A	G	I	I	I
Alias	Eu2 CC	SB0134 family	SB0134 family	F4 family	F4 family	F4 family	F9 family	Eu3 CC	Eu3 CC	Eu3 CC
Length (bp)	4,344,516	4,343,218	4,351,057	4,344,564	4,342,977	4,340,629	4,338,946	4,343,846	4,362,894	4,353,147
GC (%)	65.62	65.65	65.64	65.64	65.64	65.65	65.65	65.64	65.64	64.65
CDS	4012	3999	4014	4006	4005	3991	3986	4014	4034	4015
rRNA	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
tRNA	52	52	52	52	52	52	52	52	52	51
tmRNA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IS6110 Nb	3	1	3	2	4	3	1 truncated	1	12	1
IS1561 Nb	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IS1081 Nb	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated	5 + 1 truncated

\* MLVA loci: ETR A, ETR B, ETR C, ETR D, QUB 11a, QUB 11b, QUB 26, QUB 3232.

#### 2.4. MinION Sequencing

Each DNA sample was purified with AMPure XP beads (Beckman coulter, Villepinte, France). Samples were adjusted to 2 µg in 50 µL with Qubit (dsDNA BR Assay) quantification and diluted with DNase, RNase-free water. The MinION library was prepared according to Nanopore's protocol "Native barcoding genomic DNA (with EXP-NBD104, EXP-NBD114, and SQK-LSK109)" (Version: NBE\_9065\_v109\_revV\_14Aug2019). DNA pool of 324 ng was loaded on an (R9.4.1) flow cell and was sequenced with Oxford Nanopore MinION sequencer for 48h (Table S1).

#### 2.5. Illumina Sequencing

Nextera XT sequencing libraries were generated with the "Nextera XT DNA Library Prep" kit according to the supplier's recommendations, except for the equimolar pool preparation (GenoScreen optimization). Whole genome paired end 2 × 150 bases pairs (bp) sequencing was performed using Illumina MiSeq technology by Genoscreen (Lille, France) (Table S1). To avoid PCR overrepresented fragments during the library preparation, the paired-end FASTQ files were filtered, leaving only one pair of replicated short reads.

#### 2.6. Genome Assembly Method

The quality of sequencing reads was evaluated using FastQC (Version 0.11.9) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 10 August 2021)). Reads were trimmed with Sickle (Version 1.33) (<https://github.com/najoshi/sickle> (accessed on 10 August 2021)) using a quality Phred-score of Q20 [28,29] and Nanoflit (version 1.1.0) [30] with -q 8 and -l 500 options for long-read sequencing. For each genome, Trycycler [31] subsample was used to perform 12 different read sets from initial long reads. These data were assembled with Flye (version 2.8.3-b 1695) [32], Raven (version 1.50) [33], and Unicycler (version v0.4.9b) tools [34]. These tools give different assemblies, and a consensus assembly was obtained for each strain using Trycycler (version v0.5.0) [31]. The consensus assemblies were polished with Medaka (version 1.4.3) (<https://github.com/nanoporetech/medaka> (accessed on 10 August 2021)) to create consensus sequences and variant calls from long-read sequences against the previously assembled genome. Assemblies were corrected using short-reads and Pilon (version 1.24) [35]. Pilon was executed until 2 runs returned no corrections when the reference genome and short-reads were aligned. A circulator (version 1.5.5) [36] was used on the genomes to change the start position to the *dnaA* gene (with -min\_id 70 option) (available at GitHub [https://github.com/CiriacC/Hybrid\\_bacterial\\_genome\\_assembly](https://github.com/CiriacC/Hybrid_bacterial_genome_assembly) (accessed on 4 September 2022)). Assemblies' statistics of new complete genomes were calculated using Quast (version 5.0.2) [37].

#### 2.7. Genome Comparison

IS6110, IS1081, and IS1561 insertion sequences were screened on genomes using Bionumerics (version 7.6.2) software created by Applied Maths NV and available from <http://www.applied-maths.com> (accessed on 10 June 2022). Genomes were aligned with progressiveMauve (version 2.4.0) [38] to determine the genomic structure. The list of indels was obtained using progressiveMauve for each complete genome in comparison to genome reference (Mb3601). In this study, we selected indels of at least 10 bp. Genes involved in these genetic events were inferred in comparison to the reference genome annotation (Mb3601). A comparison of these genetic events and the already known RDs was performed according to the Bespiatykh study [39].

#### 2.8. Pangenomic Analysis

Genomic annotation was carried out with the Prokka (version 1.14.6) [40] tool using prodigal [41] and Mb3601 genbank file to predict ORF (open reading frame).

The pangenomic study was performed with Panaroo (version 1.2.8) [42] with `–merge_p-aralogue` and `–clean-mode strict` options on 12 complete genomes (10 new complete genomes and 2 reference genomes). Visualization of the pangenome, core genome, and new genes accumulation curves were computed using the “gene\_presence\_absence.Rtab” matrix provided by Panaroo analysis and PanGP software [43] with Distance Guide sample Algorithm, 500 samples size, 100 samples repeat, and 100 amplification coefficients. Accessory genes were aligned with the reference genome (Mb3601) using `blastn` [44] to search for events that could explain their affiliation to the accessory genome.

### 2.9. Whole Genome SNP Identification and Selection

Genome reads were aligned to Mb3601 using BWA mem and samtools [45,46]. Vcf files were produced using `bcftools mpileup` and the SNP calling was made with `bcftools call` (with `–vm` option) [47]. The product was filtered using `vcffilter` and `–f QUAL > 150 –f DP > 20 –f MQ > 49` options. All SNPs previously detected have been used to list all the variant positions of the panel. This list was used to make a second calling (using `bcftools mpileup` then `bcftools call` with `–m` option) only on these positions in order to have the same information for all strains and facilitate their fusion with `bcftools merge`. SNP annotation and effect prediction was performed using SnpEff and Mb3601 reference genome. The final steps of variant calling were performed with `vcflib vcfsnps`, `vcflib vcffixup`, `vcflib vcfnumalt`, and `vcffilter` (`–f ‘NUMALT = 1’` option) [48]. SNPs supported by less than five reads forward and five reads reverse were filtered. Indel and SNPs with ambiguous nucleotide present on at least one strain have also been filtered. SNPs present in PE/PPE family protein and *pks12* were also filtered because of the low confidence and the higher error rate of these regions [48–50].

### 2.10. Phylogeny Based on SNP

Evolutionary trees were inferred on Mega [51] using the maximum likelihood method (Hasegawa–Kishino–Yano model) based on concatenated and validated SNPs (7023 SNPs for 98 genomes). The trees were drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Trees were midpoint rooted. A phylogenetic tree was visualized using the Interactive Tree of Life [52].

## 3. Results

### 3.1. Complete Genomes Features

For each of the 10 genomes, we obtained a complete assembly with 1 circular contig. Genomic characteristics are consistent with previous reference genomes and show great stability in genomic characteristics [18,24]. The genetic structure of the complete genomes has high stability (Figure S1). However, some differences are present especially in length and coding sequences (CDS) number (Table 1). Mb1855 has an addition of 23,948 bp and 48 CDS in comparison to Mb2377.

All genomes have three rRNA and one tmRNA. Almost all genomes have 52 tRNA, one of them presenting a mutation in position 77 (C→T) in Mb3114, which has only 51.

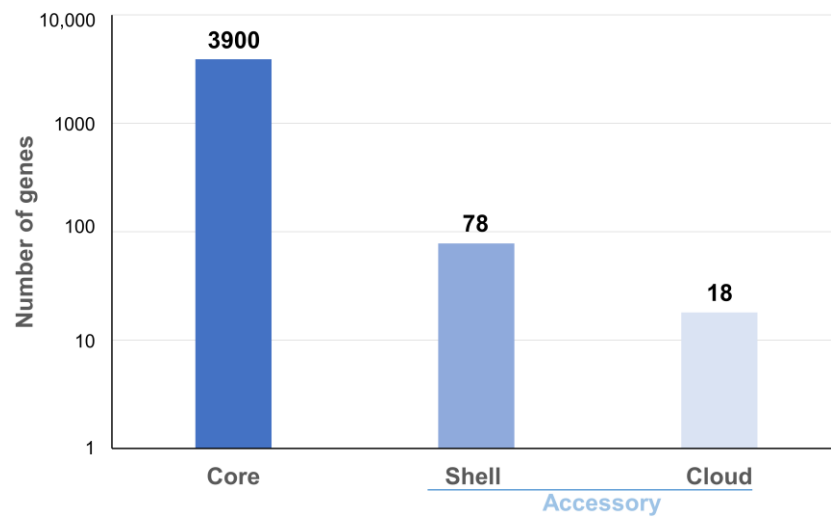
Insertion sequence (IS) analyses showed that all genomes have in the same position one copy of *IS1561* and six copies of *IS1081*, of which one is truncated (Table 1). According to our previous study [53], the number of *IS6110* is variable depending on the genotype. With 12 copies, Mb1855, which belongs to the Eu3 clonal complex, presents the highest *IS6110* (1355 bp) copy number, which is one of the main reasons for its large genome size. In Mb0820, in contrast not only to the other two Cluster A genomes Mb0531 and Mb0486 but also to the rest of the genomes belonging to other clusters, the otherwise ancestral recurrent copy of *IS6110* in the DR locus is absent. In Mb2377 genome, representing Cluster G, there is a large deletion in the DR region which encompasses a portion of *IS6110* including *orfA*. Almost all *IS6110* except for the truncated copy in Mb2377, have a duplication of 2–4 bp in their insertion sites generated during IS transposition [54,55].



Together with the presence of *IS6110* variable copy numbers, genome size differences can also be explained by the presence of deletions or insertions (indels).

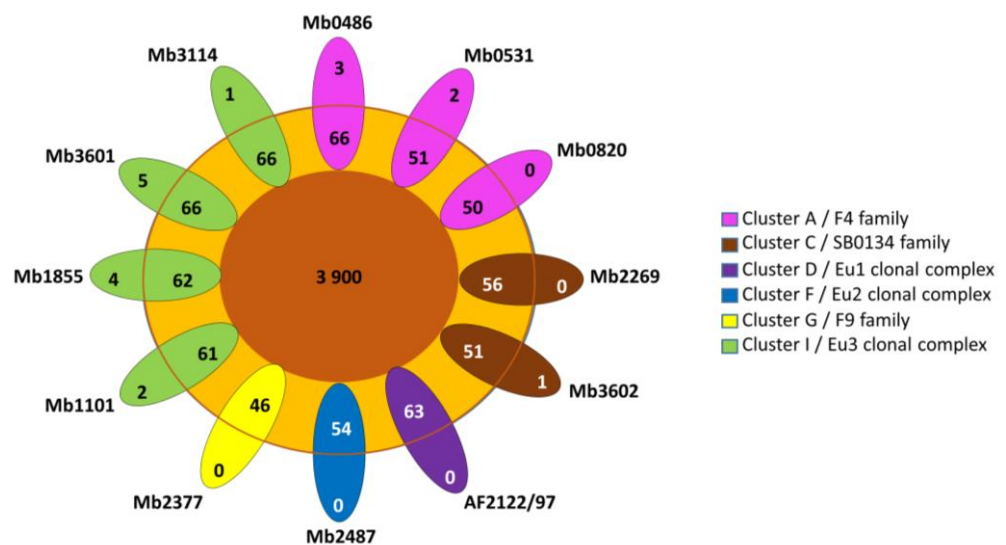
### 3.2. Pangenome Analysis and Gene Content Variation

Pangenome analysis on 12 complete genomes (10 described here, plus AF2122/97 and Mb3601) showed 3996 ortholog clusters and confirmed the high clonality of this species as regards the high core genome (98%, 3900 core genes) (Figure 1). The analysis showed 78 shell genes and 18 cloud genes (Table S2).



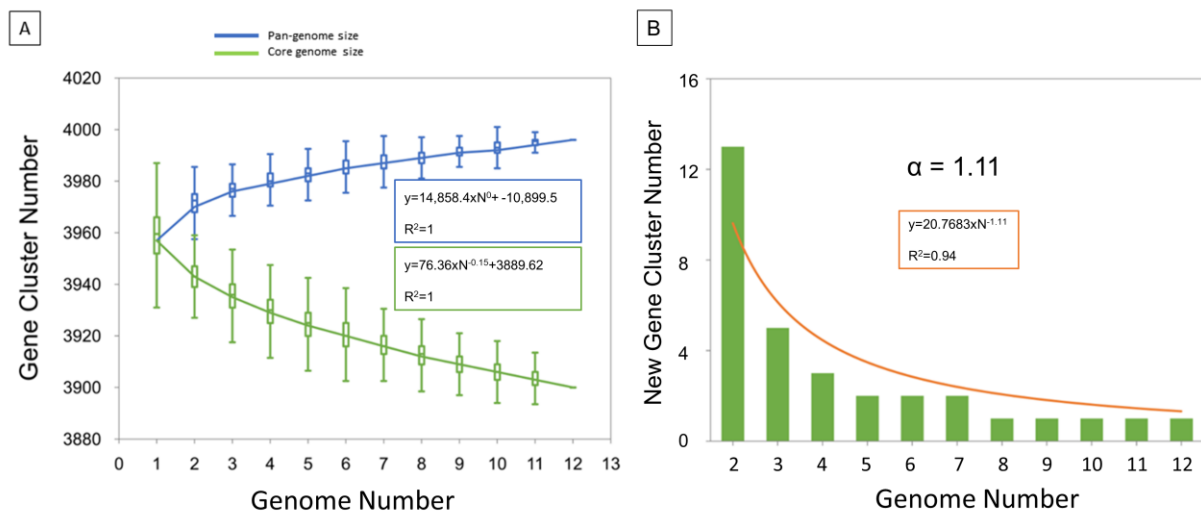
**Figure 1.** Pan-genomic histogram of 12 complete genomes of *M. bovis*. The figure shows the core and accessory genes proportion in the genome’s panel.

Cloud genes are found in seven genomes that belong to three different clusters (A, C and I) (Figure 2). Cloud genes of Mb0486 and Mb0531 correspond to PE PPE genes and one hypothetical protein for Mb0486 (Table S2). The cloud genes of Mb1101, Mb3114, and Mb3602 are annotated as hypothetical proteins. The cloud genes of Mb1855 and Mb3601 are due to *IS6110* insertion in the CDS except for *folp* found in Mb3601 (Table S2).



**Figure 2.** The gene distribution of pangenome. Flower plot showing in the center, genes present in all strains (core-genes), genes present in some strains (shell genes) in the annulus, and strain-specific genes of the 12 *M. bovis* complete genomes in the petals (cloud genes). Genomes are grouped in 6 previously described clusters [7].

The low number of accessory (shell and cloud) genes is consistent with the alpha diversity of 1.11 which highlights a closed pangenome (Figure 3). In addition, a more detailed examination of accessory genes shows that some of them are present but pseudogenized (Table S2). Indeed, 14 accessory genes have been listed due to an *IS6110* insertion which interrupts CDS. For example, the *rpfD\_2* orthologous gene present in Mb3601 is due to *IS6110* insertion, in *rpfD*. Fourteen other accessory genes were implied in the putative PhiRv1 phage protein (RD3) [39]. RD3 is present in the three complete genomes of Cluster A, Mb3602 (Cluster C), and Mb2377 (Cluster G). Two of the ortholog clusters present in RD3 are absent in Mb1101 but this genome has the other 12.



**Figure 3.** Pan-genome profile calculated with PanGP tool. (A) The figure shows two gene cluster accumulation curves for pangenome (blue) and core genome (green). (B) Evolution of new gene cluster numbers over genome number. The trend line (in orange) defines the curve equation and the alpha diversity.

The other 16 accessory genes concern PE and PPE genes. These genes are known to be highly polymorphic and are often excluded from analyses [56]. They were excluded from our wgSNP study but not from the indel analysis. The region with the most indels found in our study, located at position 3,890,000 bp in Mb3601 genome, encompasses PE PGRS genes (*pe\_pgrs* 59, *pe\_pgrs* 54, *pe\_pgrs* 56 and *pe\_pgrs* 53). Other regions presenting numerous indels are CRISPR-Cas (position 3,090,000 bp in Mb3601) or a region including PPE genes (position 2,165,000 bp in Mb3601). This result shows that the indel distribution is not random (Table S3).

The comparison of complete genomes against Mb3601 as reference genome shows 72 indels for Mb2487, 56 for Mb1101, 54 for Mb1855, 34 for Mb3114, 74 for Mb0820, 88 for Mb0531, 83 for Mb0486, 58 for Mb2377, 77 for Mb2269, and 69 for Mb3602 (Table S3).

Some large indels (more than 2 kb) were identified in the complete genomes (Tables 2 and S3).

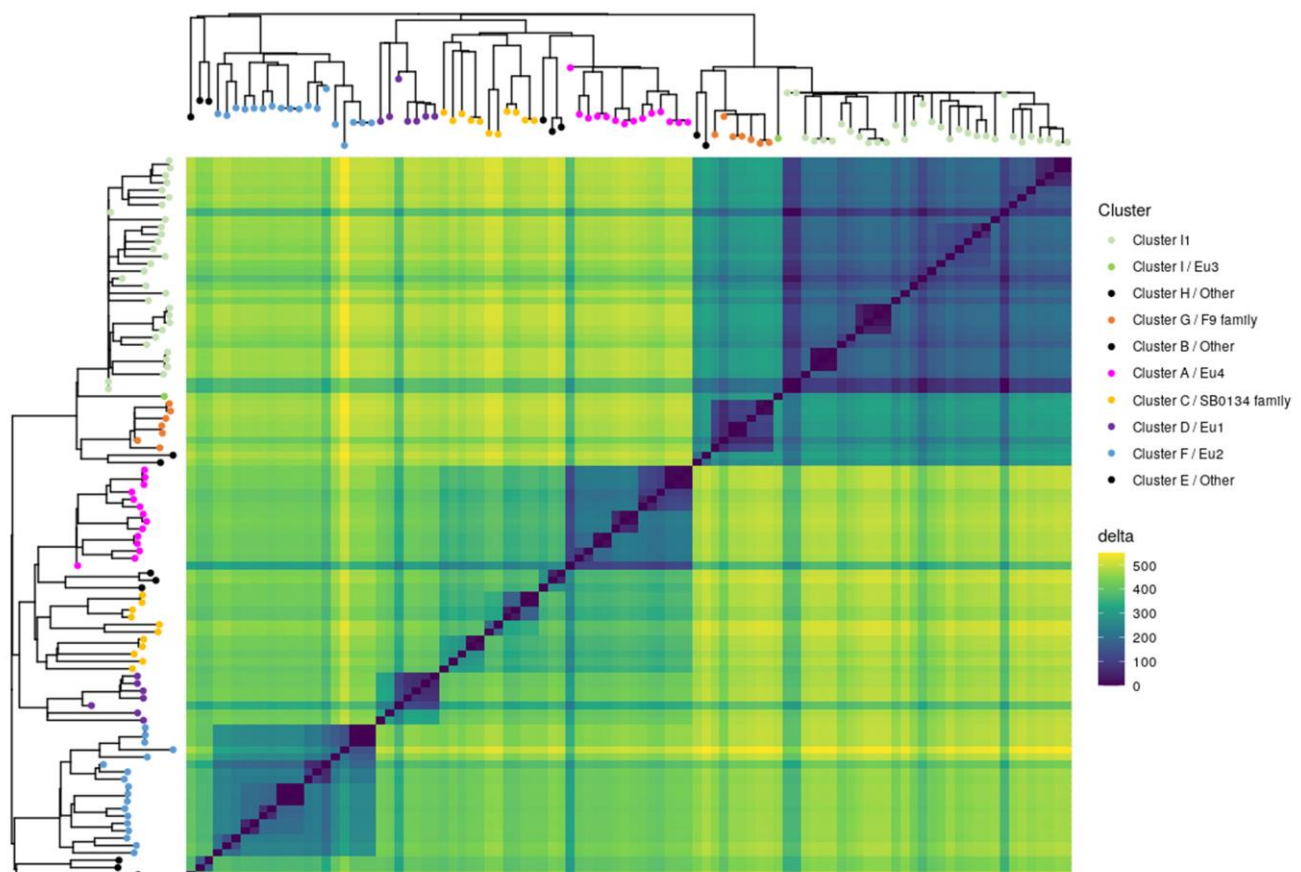
### 3.3. Contribution of the Complete Genome to *M. bovis* Lineages Definition

Obtaining complete genomes was an opportunity to revisit the population structure of French *M. bovis* strains by looking at the topology of the SNP-based phylogenetic tree and identifying genetic traits that could complete the new nomenclature covering the main *M. bovis* phylogenetic groups [11]. 7023 SNPs were found among the 98 genomes (12 complete and 86 draft genomes) (Table S4). The majority (87.7%) of SNPs were present in CDS and 12.3% are intergenic. The analysis showed that 31.4% are synonymous variants and 56.3% are non-synonymous variants. The phylogenetic distribution of SNPs, shown in Figure 4, discriminated *M. bovis* genomes into 10 clusters well resolved by at least 200 SNP. This population structure is congruent with previous studies [7,53]. Indeed, the heatmap

clearly highlights lineages based on the absolute SNP distance between strains, which supports a very clear separation between the lineage La1.2 (clusters G+H+I) and lineage La1.8.2 (cluster A+B+C). However, lineages 1.7 or 1.8 are not clearly identified in this figure.

**Table 2.** Details of large indels affecting the genomes.

Nomenclature	Length (in bp)	Number of Locus Tags Associated	Genome
Indel-Mb0531-33	2384	5	Mb0531
Indel-Mb0486-6	3148	4	Mb0486
Indel-Mb0486-11	3634	4	Mb0486
Indel-Mb3602-33	2150	2	Mb3602
Indel-Mb2269-1	2122	4	Mb2269
Indel-Mb2269-24	2368	6	Mb2269
Indel-Mb2487-5	2691	3	Mb2487
Indel-Mb2487-36	2387	6	Mb2487
Indel-Mb2487-50/RDBovis	2409	3	Mb2487
Indel-Mb2377-27	5539	6	Mb2377
Indel-Mb1101-1	2966	2	Mb1101
Indel-Mb1101-8	4384	2	Mb1101
Indel-Mb1101-21	1160	1	Mb1101
Indel-Mb1855-26	1730	1	Mb1855
Indel-Mb1855-29	3058	3	Mb1855



**Figure 4.** *M. bovis* isolates separated into clusters. The heatmap illustrates pairwise SNP distance between genomes belonging to each cluster. Both axes have a maximum-likelihood SNP-based tree inferred on 98 genomes with leaf colored according to cluster defined in this study. Trees were midpoint rooted. The SNP difference key is shown on the right.

All groups described in this study have specific SNPs (Figure 5). Some groups have few specific SNP such as Cluster C, and Eu3. Other groups have more than 60 specific SNPs such as Eu2, Cluster A, or Cluster G.

<i>M. bovis</i> group	Complete genome	Specific SNPs	Specific indels	Other specific genetic characteristic
La1.8 + La1.7		108	8	
La1.7		6		
La1.7.X / unk4		5		
La1.7.1 / Eu2	Mb2487	77		missing spoligotype spacer 21
La1.8		12	3	
La1.8.1 / Eu1	AF2122/97	47		RDEu1
La1.8.2 / unk7		27	4	
Cluster C / SB0134 family	Mb3602 / Mb2269	4	1	missing spoligotype spacers 4 and 5
Cluster B / Other		47		
Cluster A / F4 family	Mb0820 / Mb0531 / Mb0486	66	8	missing spoligotype spacer 33 and QUB26 truncated
La1.2 / unk2		108	8	
Cluster G / F9 family	Mb2377	83		missing spoligotype spacers 1 to 17/ IS6110 truncated
Cluster H / Other		46		
Cluster I / Eu3	Mb1101	2		
Cluster I1	Mb3601 / Mb3114 / Mb1855	53	3	

**Figure 5.** List of specific genetic events of the different *M. bovis* groups (Table S4). The colors of the *M. bovis* groups are in accordance with the previously described clusters and lineage Hauer et al. 2019 [7].

Indels were also examined on the 98 genomes and the specificity of an indel for an *M. bovis* group was determined when it was identified in all genomes of this group (Figure 5).

### 3.3.1. Cluster A/F4 Family

Three complete genomes were obtained for Cluster A: Mb0486, Mb0820, and Mb0531. This cluster is described by 66 specific SNPs and 8 specific indels (Table S4). In comparison to Mb3601, the deletions involve *metk* (MBS3601\_RS07300) and a *leuA* (MBS3601\_RS19090) partial deletion. However, *leuA* was also partially deleted in the different and larger indel of Mb2487 (cluster F). Two recurrent IS6110 insertions sites were found in the three complete genomes. Other genomic characteristics of this cluster are the absence of spacer 33 in the DR region, RD3, and the truncated repetition of QUB26.

### 3.3.2. Cluster C/SB0134 Family

This cluster is composed of two subgroups and is described by few SNP and only one deletion of 514 bp (Figures 4 and 5). This group does not present spacers 4 and 5 in their spoligotypes. Mb3602 and Mb2269 are present in each of these subgroups.

### 3.3.3. Cluster F/Eu2

Mb2487 is representative of this clonal complex, which is defined by 77 SNPs, including that in *guaA* described originally [3] and a lack of spacer 21 in their spoligotypes.

### 3.3.4. Lineages 1.7 and 1.8

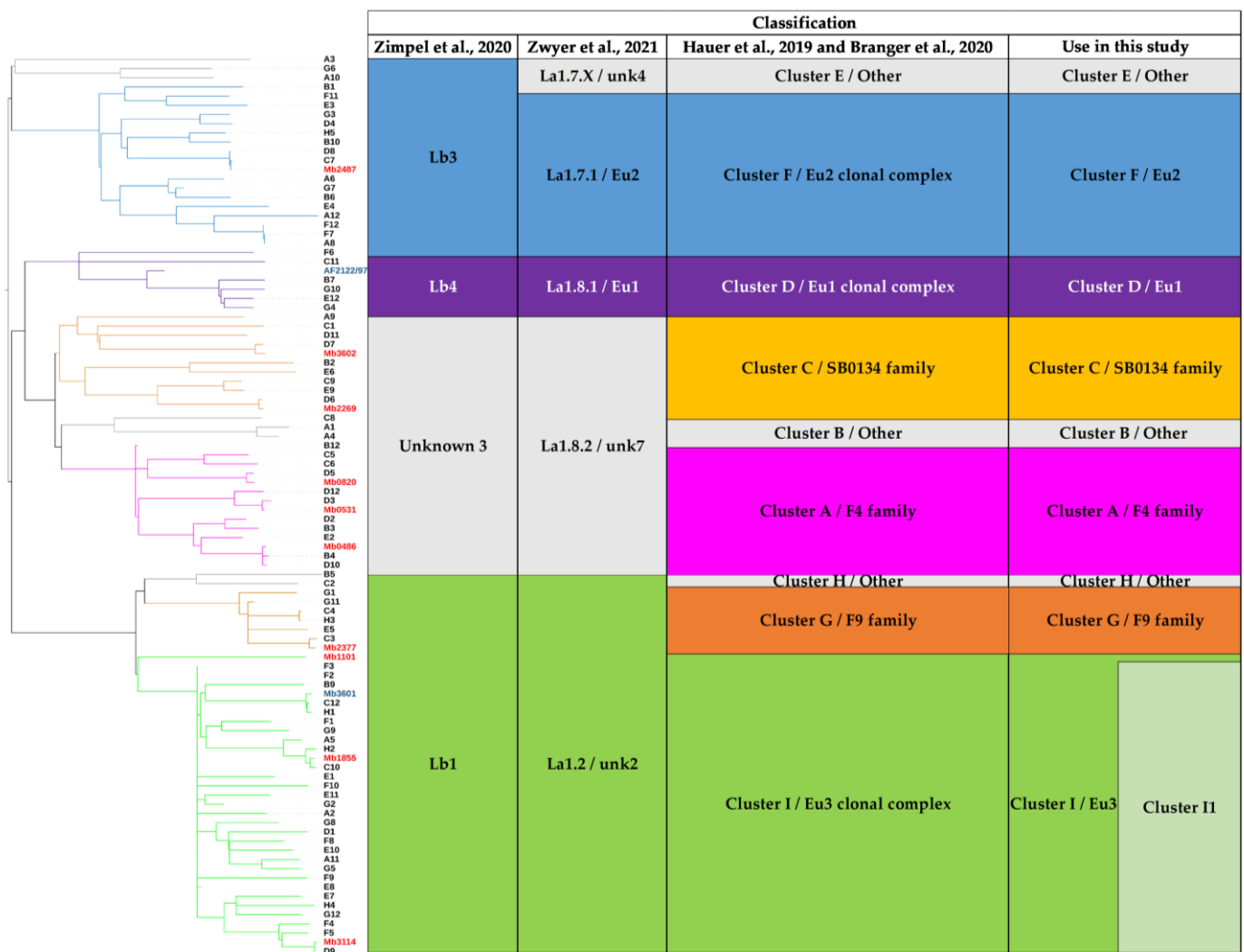
A deletion of 2409 bp (Indel-Mb0486-49, Indel-Mb0531-56, Indel-Mb0820-44, Indel-Mb3602-44, Indel-Mb2269-47, and Indel-Mb2487-50) which corresponds to RDBovis [39] is common to genomes of cluster A, C, and F and allow to define the lineage La1.7 + La1.8. This lineage is also defined by 108 SNPs and an insertion of more than 2000 bp (Indel-Mb2487-64, Indel-Mb2269-63, Indel-Mb3602-58, Indel-Mb0820-65, Indel-Mb0531-76, and Indel-Mb0486-49). However, the insertion present in Mb2487 is the largest compared to those in the other complete genomes. This region contains PPE genes. These two indels are also present in AF2122/97, as shown in a previous study comparing this genome to Mb3601.

### 3.3.5. Cluster G/F9 Family

Mb2377 is representative of cluster G, which is defined by 83 SNPs. As mentioned before, this cluster is characterized by the truncated *IS6110* in the DR region and the lack of spacer 1 to 17. These specific genetic characteristics are due to a large indel (Indel-Mb2377-27).

### 3.3.6. Cluster I/Eu3

In addition to Mb3601, three complete genomes were obtained for this cluster, which is the most represented among the strains studied in France [12,14]. The Eu3 clonal complex is only defined by two SNPs. Indeed, Mb1101 is close to BCG vaccine strains and is separated from other Eu3 strains (Figure 6).



**Figure 6.** Phylogenetic tree of 98 *M. bovis* genomes. The two previous reference genomes (Mb3601 and AF2122/97) are marked in blue. The 10 new complete genomes are indicated in red. The phylogenetic tree is based on 7023 whole genome SNPs. The strains are grouped according to the previous classification Hauer et al. 2019, Zwyer et al. 2021 and Guimares et al. 2020 [7,11,16]. The colors of the *M. bovis* groups are in accordance with the previously described clusters and lineages Hauer et al. 2019, Zimpel et al. 2020 and Zwyer et al. 2021 [7,10,11].

We propose to define Cluster I1 which corresponds to Cluster I strains by removing vaccine strains and Mb1101. Mb3114, Mb3601, and Mb1855 are present in this cluster, which is defined by 53 SNPs and 3 indels. One of these indels, a deletion of 622 bp, includes *VapB46* (Tables S3 and S4).



#### 4. Discussion

Using Illumina and MinION sequencing technologies, 10 complete genomes of *M. bovis* were obtained and represented—with AF2122/97 and Mb3601—the main *M. bovis* clusters described previously [7]. Our analysis showed highly similar genomic features and a conserved synteny within these new 10 complete genomes. Pangenome established with the ten complete genomes and the two other available complete genomes [18,24] confirmed a closed pangenome with a core gene representing 98% of total genes in agreement with previous studies [4,15,57]. However, a recent study using the “Get-homologues pipeline” and draft genomes showed an open pangenome and a larger accessory genome in comparison to our study [58,59]. This difference can be explained by the short-read sequences data, which lead to the increase of the accessory genome [15]. To overcome this problem, Panaroo can be used to clean up annotation errors due to fragmented assemblies or misassembly [42]. Indeed, Panaroo produces superior ortholog clusters, which induce a reduction in the accessory genome estimate size and an increase in the core genome. The pangenomic analysis of 12 complete genomes highlighted an alpha diversity of 1.11 consistent with a closed pangenome [60]. In addition, the presence or absence of certain ortholog clusters in genomes is due to gene pseudogenization. Our analysis showed that the size of the core genome decreases more rapidly than the increase in the pangenome size corroborating that evolution of the MTBC complex members genomes, as recently demonstrated for *M. bovis* [61], occurs by gene loss or pseudogenized instead of gene gain. This event could explain the pathogen’s host specialization as shown in *M. tuberculosis* [62,63].

Among genomic features, we observed variations in genomes size between the 10 complete genomes. This observation was explained by a variable number of copies of IS6110 according to the genomes and the indel content. Indeed, the 12 copies of IS6110 in Mb1855 represent an addition of 14,905 bp in comparison to genomes with only one copy of IS6110. The complete genomes allowed us to confirm the presence of multiple copies of IS6110 in certain *M. bovis* genotypes according to our previous study [24,53]. The transposition of this genetic element can play an important role in bacterial evolution by interrupting or leading to the overexpression of genes [53,64–66]. Indeed, some genetic changes such as gene deletion or gene pseudogenization that could affect the core genome, can be attributed to IS6110. Multiple examples are present in literature and show the deletion of some genes like *cas* genes in the CRISPR-Cas locus [65]. In our study, one of these examples is present in Cluster G strains with the absence of *Cas* genes and the first 17 spoliotype spacers. However, except for this example, all IS6110 have a duplication of 2–4 bp in their insertion sites which in the nine other complete genomes shows the absence of IS recombination events between two IS6110.

Indels can also explain length differences among genomes. Some large deletions are identified in this study as Indel-Mb2377-27 of 5539 bp in Mb2377, Indel-Mb2487-64 of 5166 bp in Mb2487, RDBovis of 2409 bp present in genomes of La1.7 and La1.8 or RD3 of 9253 bp present in Cluster A and several other genomes [39]. This last indel corresponds to prophage phiRv1 which seems to have a role in host hypoxia [61,67,68]. However, Mb1101 has a specific deletion pattern in this region that involves two ortholog clusters instead of 14 in RD3. In addition, our results showed that indel positions are not random. Many indels are present in the CRISPR-Cas region [65] but the most polymorphic region is that containing PE and PPE genes. This high frequency of deletions and insertions in these regions is in agreement with the previous *M. bovis* complete genome publication [24]. Further studies on these indels are needed to better understand their role in bacterial evolution.

In this study, the selected *M. bovis* strains to obtain complete genomes, represent the main genotypes responsible for TB outbreaks in France and are also representative of *M. bovis* genotypes found in other countries. Indeed, Mb2487 belongs to the lineage 1.7.1, formerly described as Eu2 clonal complex [3,8,11]. Four complete genomes belong to lineage La 1.2, 3 of which belong to the Eu3 clonal group (in addition to Mb3601). Mb1855 is representative of highly prevalent strains in France with several copies of IS6110. Mb3114 is representative of a common genotype in Italy with only one copy of IS6110 [69]. Five

genomes belong to lineage 1.8.2. This lineage had previously been separated in the Hauer study into Cluster A, B, and C [7]. Harmonization of the nomenclature used to describe *M. bovis* lineages may facilitate comparisons of WGS studies. Specific indels and SNPs were described for complete genomes or *M. bovis* lineages. Some of these genetic events such as *guaA* and other 68 SNPs specific to the Eu2 strains [10], already described in the literature, were confirmed in this study. Nevertheless, the number of specific SNPs found for the previously described clusters was larger than what was found in a recent study [11]. These differences can be explained by the smaller number of strains used in our study. This result shows the importance of using a panel of strains as exhaustive as possible to describe specific events of the *M. bovis* lineage. Some indels were found to be specific to *M. bovis* lineages, others appear to be specific to certain genomes. They will need to be investigated in larger panels of strains to determine if they are the signature of groups or subgroups of *M. bovis*.

TB cattle outbreaks in France are present in specific regions where *M. bovis* circulates in wild and domestic communities of hosts [13,25] where the transmission links between infected animals remain difficult to establish as *M. bovis* strains share spoligotype and a multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) identical profiles [70–72]. WGS-SNP can be used to refine these studies but requires adapted reference genomes to the field strains. Mb3601 and other representative complete genomes could be used to improve epidemiological studies for the surveillance of TB and contact tracing between infected animals [16]. The new complete genomes described in this study are closer to field strains than AF2122/97, the genome used as a reference until now, which will allow better epidemiological surveillance of the disease based on WGS data.

## 5. Conclusions

Ten new *M. bovis* complete genomes were obtained in this study. These new complete genomes cover the *M. bovis* French diversity but are also representative of *M. bovis* lineages present in other countries. These genomes allow us to better describe *M. bovis* lineages. A comparison of these complete genomes confirmed that the global genome organization of *M. bovis* is very stable and shows a closed pangenome. The search for indels and SNPs made it possible to specify certain genomic traits and the absence of certain genes characterizing each cluster described in this article.

These complete genomes, adapted to *M. bovis* clusters, will be useful to better understand TB transmission dynamics in multi-host systems and therefore to implement more effective control measures.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11010177/s1>, Figure S1: Alignments of the 12 *M. bovis* complete genomes. Table S1: Sequencing metric of the 10 new genomes and obtained with fastqc. A: Metric provide to Illumina metric. B: metric provide to MinION metric. Table S2: Pangenomic study performed on 12 *M. bovis* complete genomes. The table indicates the genes accessory. "1" shows the presence of CDS and "0" his absence. Table S3: Indels between the ten new complete genomes and Mb3601 using progressiveMauve. Table S4: WgSNP analysis performed on 98 *M. bovis*.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.L.B., F.B. and L.M.; Experimental work, C.C. (Ciriac Charles), C.C. (Cyril Conde), T.C., F.V. and M.L.B. Software, C.C. (Ciriac Charles), C.C. (Cyril Conde) and L.M.; Formal Analysis, C.C. (Ciriac Charles), C.C. (Cyril Conde), M.L.B. and L.M.; Writing—Original Draft Preparation, C.C. (Ciriac Charles), M.L.B., L.M. and F.B.; Writing—Review and Editing, C.C. (Ciriac Charles), C.C. (Cyril Conde), M.L.B., L.M. and F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** CCh is a doctoral fellow financed by the ANSES and the One Health European Joint Programme (OHEJP), Grant number 773830.

**Data Availability Statement:** The raw data are deposited in a public domain server at the NCBI SRA database, under BioProject accession number PRJNA832544.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Berg, S.; Garcia-Pelayo, M.C.; Müller, B.; Hailu, E.; Asiimwe, B.; Kremer, K.; Dale, J.; Boniotti, M.B.; Rodriguez, S.; Hilty, M.; et al. African 2, a Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Epidemiologically Important in East Africa. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 670–678. [\[CrossRef\]](#)
- Muller, B.; Hilty, M.; Berg, S.; Garcia-Pelayo, M.C.; Dale, J.; Boschioli, M.L.; Cadmus, S.; Ngandolo, B.N.R.; Godreuil, S.; Diguimbaye-Djaibé, C.; et al. African 1, an Epidemiologically Important Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 1951–1960. [\[CrossRef\]](#)
- Rodriguez-Campos, S.; Schürch, A.C.; Dale, J.; Lohan, A.J.; Cunha, M.V.; Botelho, A.; De Cruz, K.; Boschioli, M.L.; Boniotti, M.B.; Pacciarini, M.; et al. European 2—A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 866–872. [\[CrossRef\]](#)
- Smith, N.H.; Berg, S.; Dale, J.; Allen, A.; Rodriguez, S.; Romero, B.; Matos, F.; Ghebremichael, S.; Karoui, C.; Donati, C.; et al. European 1: A globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, 1340–1351. [\[CrossRef\]](#)
- Almaw, G.; Mekonnen, G.A.; Mihret, A.; Aseffa, A.; Taye, H.; Conlan, A.J.K.; Gumi, B.; Zewude, A.; Aliy, A.; Tamiru, M.; et al. Population structure and transmission of *Mycobacterium bovis* in Ethiopia. *Microb. Genom.* **2021**, *7*, 000539. [\[CrossRef\]](#)
- da Conceição, M.L.; Conceição, E.C.; Furlaneto, I.P.; Da Silva, S.P.; Guimarães, A.E.D.S.; Gomes, P.; Boschioli, M.L.; Michelet, L.; Kohl, T.A.; Kranzer, K.; et al. Phylogenomic Perspective on a Unique *Mycobacterium bovis* Clade Dominating Bovine Tuberculosis Infections among Cattle and Buffalos in Northern Brazil. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1747. [\[CrossRef\]](#)
- Hauer, A.; Michelet, L.; Cochard, T.; Branger, M.; Nunez, J.; Boschioli, M.-L.; Biet, F.; Hauer, A.; Michelet, L.; Cochard, T.; et al. Accurate Phylogenetic Relationships among *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in France Based on Whole Genome Sequencing and Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 955. [\[CrossRef\]](#)
- Kohl, T.A.; Kranzer, K.; Andres, S.; Wirth, T.; Niemann, S.; Moser, I. Population Structure of *Mycobacterium bovis* in Germany: A Long-Term Study Using Whole-Genome Sequencing Combined with Conventional Molecular Typing Methods. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01573-20. [\[CrossRef\]](#)
- Loiseau, C.; Menardo, F.; Aseffa, A.; Hailu, E.; Gumi, B.; Ameni, G.; Berg, S.; Rigouts, L.; Robbe-Austerman, S.; Zinsstag, J.; et al. An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evol. Med. Public Health* **2020**, *2020*, 49–59. [\[CrossRef\]](#)
- Zimpel, C.K.; Patané, J.S.L.; Guedes, A.C.P.; de Souza, R.F.; Silva-Pereira, T.T.; Camargo, N.C.S.; Filho, A.F.D.S.; Ikuta, C.Y.; Neto, J.S.F.; Setubal, J.C.; et al. Global Distribution and Evolution of *Mycobacterium bovis* Lineages. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 843. [\[CrossRef\]](#)
- Zwyer, M.; Çavusoglu, C.; Ghielmetti, G.; Pacciarini, M.L.; Scaltriti, E.; Van Soelingen, D.; Dötsch, A.; Reinhard, M.; Gagneux, S.; Brites, D. A new nomenclature for the livestock-associated *Mycobacterium tuberculosis* complex based on phylogenomics. *Open Res. Eur.* **2021**, *1*, 100. [\[CrossRef\]](#)
- Boschioli, M.; Michelet, L.; Hauer, A.; De Cruz, K.; Courcou, A.; Hénault, S.; Palisson, A.; Karoui, C.; Biet, F.; Zanella, G. Tuberculose bovine en France: Cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000–2013. *Bull. Épidémiologique* **2015**, *70*, 2–8.
- Hauer, A.; De Cruz, K.; Cochard, T.; Godreuil, S.; Karoui, C.; Henault, S.; Bulach, T.; Bañuls, A.-L.; Biet, F.; Boschioli, M. Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117103. [\[CrossRef\]](#)
- Michelet, L.; Durand, B.; Boschioli, M.-L. Tuberculose bovine: Bilan génotypique de *M. bovis* à l'origine des foyers bovins entre 2015 et 2017 en France Métropolitaine. *Bull. Epidemiol.* **2020**, *91*, 13.
- Ceres, K.M.; Stanhope, M.J.; Gröhn, Y.T. A critical evaluation of *Mycobacterium bovis* pangenomics, with reference to its utility in outbreak investigation. *Microb. Genom.* **2022**, *8*, 000839. [\[CrossRef\]](#)
- Guimaraes, A.M.S.; Zimpel, C.K. *Mycobacterium bovis*: From Genotyping to Genome Sequencing. *Microorganisms* **2020**, *8*, 667. [\[CrossRef\]](#)
- Farrell, D.; Crispell, J.; Gordon, S.V. Updated functional annotation of the *Mycobacterium bovis* AF2122/97 reference genome. *Access Microbiol.* **2020**, *2*, e000129. [\[CrossRef\]](#)
- Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Camus, J.-C.; Medina, N.; Mansoor, H.; Pryor, M.; Duthoy, S.; Grondin, S.; Lacroix, C.; Monsempe, C.; et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7877–7882. [\[CrossRef\]](#)
- Crispell, J.; Cassidy, S.; Kenny, K.; McGrath, G.; Warde, S.; Cameron, H.; Rossi, G.; MacWhite, T.; White, P.C.L.; Lycett, S.; et al. *Mycobacterium bovis* genomics reveals transmission of infection between cattle and deer in Ireland. *Microb. Genom.* **2020**, *6*, e000388. [\[CrossRef\]](#)
- Crispell, J.; Zadoks, R.N.; Harris, S.R.; Paterson, B.; Collins, D.M.; De-Lisle, G.W.; Livingstone, P.; Neill, M.A.; Biek, R.; Lycett, S.J.; et al. Using whole genome sequencing to investigate transmission in a multi-host system: Bovine tuberculosis in New Zealand. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 180. [\[CrossRef\]](#)
- Ortiz, A.P.; Perea, C.; Davalos, E.; Velázquez, E.F.; González, K.S.; Camacho, E.R.; Latorre, E.A.G.; Lara, C.S.; Salazar, R.M.; Bravo, D.M.; et al. Whole Genome Sequencing Links *Mycobacterium bovis* from Cattle, Cheese and Humans in Baja California, Mexico. *Front. Veter.-Sci.* **2021**, *8*, 674307. [\[CrossRef\]](#)



22. Price-Carter, M.; Brauning, R.; De Lisle, G.W.; Livingstone, P.; Neill, M.; Sinclair, J.; Paterson, B.; Atkinson, G.; Knowles, G.; Crews, K.; et al. Whole Genome Sequencing for Determining the Source of *Mycobacterium bovis* Infections in Livestock Herds and Wildlife in New Zealand. *Front. Veter-Sci.* **2018**, *5*, 272. [[CrossRef](#)]
23. Salvador, L.C.M.; O'Brien, D.J.; Cosgrove, M.K.; Stuber, T.P.; Schooley, A.M.; Crispell, J.; Church, S.V.; Gröhn, Y.T.; Robbe-Auerman, S.; Kao, R.R. Disease management at the wildlife-livestock interface: Using whole-genome sequencing to study the role of elk in *Mycobacterium bovis* transmission in Michigan, USA. *Mol. Ecol.* **2019**, *28*, 2192–2205. [[CrossRef](#)]
24. Branger, M.; Loux, V.; Cocharde, T.; Boschioli, M.L.; Biet, F.; Michelet, L. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* Mb3601, a SB0120 spoligotype strain representative of a new clonal group. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *82*, 104309. [[CrossRef](#)]
25. Delavenne, C.; Pandofi, F.; Girard, S.; Réveillaud, É.; Boschioli, M.-L.; Dommergues, L.; Garapin, F.; Keck, N.; Martin, F.; Moussu, M.; et al. Tuberculose bovine: Bilan et évolution de la situation épidémiologique entre 2015 et 2017 en France Métropolitaine. *Bull. Epidemiol. Infect.* **2020**, *91*, 12.
26. Biek, R.; O'Hare, A.; Wright, D.; Mallon, T.; McCormick, C.; Orton, R.J.; McDowell, S.; Trewby, H.; Skuce, R.A.; Kao, R.R. Whole Genome Sequencing Reveals Local Transmission Patterns of *Mycobacterium bovis* in Sympatric Cattle and Badger Populations. *PLOS Pathog.* **2012**, *8*, e1003008. [[CrossRef](#)]
27. Imai, T.; Ohta, K.; Kigawa, H.; Kanoh, H.; Taniguchi, T.; Tobari, J. Preparation of High-Molecular-Weight DNA: Application to Mycobacterial Cells. *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 479–482. [[CrossRef](#)]
28. Wingett, S.W.; Andrews, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* **2018**, *7*, 1338. [[CrossRef](#)]
29. Xia, E.; Teo, Y.-Y.; Ong, R.T.-H. SpoTyping: Fast and accurate in silico Mycobacterium spoligotyping from sequence reads. *Genome Med.* **2016**, *8*, 1–9. [[CrossRef](#)]
30. De Coster, W.; D'Hert, S.; Schultz, D.T.; Cruets, M.; Van Broeckhoven, C. NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 2666–2669. [[CrossRef](#)]
31. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Cerdeira, L.T.; Hawkey, J.; Méric, G.; Ben Vezina, B.; Wyres, K.L.; Holt, K.E. Tricycler: Consensus long-read assemblies for bacterial genomes. *Genome Biol.* **2021**, *22*, 266. [[CrossRef](#)]
32. Kolmogorov, M.; Yuan, J.; Lin, Y.; Pevzner, P.A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 540–546. [[CrossRef](#)]
33. Vaser, R.; Šikić, M. Raven: A de novo genome assembler for long reads. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
34. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005595. [[CrossRef](#)]
35. Walker, B.J.; Abeel, T.; Shea, T.; Priest, M.; Abouelliel, A.; Sakthikumar, S.; Cuomo, C.A.; Zeng, Q.; Wortman, J.; Young, S.K.; et al. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112963. [[CrossRef](#)]
36. Hunt, M.; De Silva, N.; Otto, T.D.; Parkhill, J.; Keane, J.A.; Harris, S.R. Circlator: Automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 294. [[CrossRef](#)]
37. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075. [[CrossRef](#)]
38. Darling, A.E.; Tritt, A.; Eisen, J.A.; Facciotti, M.T. Mauve Assembly Metrics. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2756–2757. [[CrossRef](#)]
39. Bespyatykh, D.; Bespyatykh, J.; Mokrousov, I.; Shitikov, E. A Comprehensive Map of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Regions of Difference. *MSphere* **2021**, *6*, e0053521. [[CrossRef](#)]
40. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)]
41. Hyatt, D.; Chen, G.-L.; Locascio, P.F.; Land, M.L.; Larimer, F.W.; Hauser, L.J. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 119. [[CrossRef](#)]
42. Tonkin-Hill, G.; MacAlasdair, N.; Ruis, C.; Weimann, A.; Horesh, G.; Lees, J.A.; Gladstone, R.A.; Lo, S.; Beaudoin, C.; Floto, R.A.; et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol.* **2020**, *21*, 180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhao, Y.; Jia, X.; Yang, J.; Ling, Y.; Zhang, Z.; Yu, J.; Wu, J.; Xiao, J. PanGP: A tool for quickly analyzing bacterial pan-genome profile. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1297–1299. [[CrossRef](#)]
44. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
45. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. [[CrossRef](#)]
46. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
47. Danecek, P.; Bonfield, J.K.; Liddle, J.; Marshall, J.; Ohan, V.; Pollard, M.O.; Whitwham, A.; Keane, T.; McCarthy, S.A.; Davies, R.M.; et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* **2021**, *10*, giab008. [[CrossRef](#)]
48. Marin, M.; Vargas, R.; Harris, M.; Jeffrey, B.; Epperson, L.E.; Durbin, D.; Strong, M.; Salfinger, M.; Iqbal, Z.; Akhundova, I.; et al. Genomic sequence characteristics and the empiric accuracy of short-read sequencing. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]

49. Lorente-Leal, V.; Farrell, D.; Romero, B.; Álvarez, J.; de Juan, L.; Gordon, S.V. Performance and Agreement Between WGS Variant Calling Pipelines Used for Bovine Tuberculosis Control: Toward International Standardization. *Front. Veter.-Sci.* **2021**, *8*, 780018. [[CrossRef](#)]
50. Meehan, C.J.; Goig, G.; Kohl, T.A.; Verboven, L.; Dippenaar, A.; Ezewudo, M.; Farhat, M.R.; Guthrie, J.L.; Laukens, K.; Miotto, P.; et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: Current standards and open issues. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *17*, 533–545. [[CrossRef](#)]
51. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Charles, C.; Conde, C.; Biet, F.; Boschiroli, M.L.; Michelet, L. IS6110 Copy Number in Multi-Host *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in Bovine Tuberculosis Endemic French Regions. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 891902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dale, J.W. Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur. Respir. J. Suppl.* **1995**, *20*, 633s–648s.
55. Mendiola, M.; Martin, C.; Otal, I.; Gicquel, B. Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res. Microbiol.* **1992**, *143*, 767–772. [[CrossRef](#)]
56. Gupta, A.; Alland, D. Reversible gene silencing through frameshift indels and frameshift scars provide adaptive plasticity for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4702. [[CrossRef](#)]
57. Galagan, J.E. Genomic insights into tuberculosis. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 307–320. [[CrossRef](#)]
58. Contreras-Moreira, B.; Vinuesa, P. GET\_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 7696–7701. [[CrossRef](#)]
59. Reis, A.C.; Cunha, M.V. The open pan-genome architecture and virulence landscape of *Mycobacterium bovis*. *Microb. Genom.* **2021**, *7*, 000664. [[CrossRef](#)]
60. Richard, G. Eukaryotic Pangenomes. In *The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes*; Tettelin, H., Medini, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2020. [[CrossRef](#)]
61. Zimpel, C.K.; Brandão, P.E.; de Souza Filho, A.F.; de Souza, R.F.; Ikuta, C.Y.; Ferreira Neto, J.S.; Camargo, N.C.S.; Heinemann, M.B.; Guimarães, A.M.S. Complete Genome Sequencing of *Mycobacterium bovis* SP38 and Comparative Genomics of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* Strains. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2389. [[CrossRef](#)]
62. Baumler, A.; Fang, F.C. Host Specificity of Bacterial Pathogens. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, a010041. [[CrossRef](#)]
63. Bolotin, E.; Hershberg, R. Gene Loss Dominates As a Source of Genetic Variation within Clonal Pathogenic Bacterial Species. *Genome Biol. Evol.* **2015**, *7*, 2173–2187. [[CrossRef](#)]
64. Gonzalo-Asensio, J.; Pérez, I.; Aguilo, N.; Uranga, S.; Picó, A.; Lampreave, C.; Cebollada, A.; Otal, I.; Samper, S.; Martín, C. New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages. *PLOS Genet.* **2018**, *14*, e1007282. [[CrossRef](#)]
65. Refrégier, G.; Sola, C.; Guyeux, C. Unexpected diversity of CRISPR unveils some evolutionary patterns of repeated sequences in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 1–12. [[CrossRef](#)]
66. Soto, C.Y.; Menéndez, M.C.; Pérez, E.; Samper, S.; Gómez, A.B.; García, M.J.; Martín, C. IS6110 Mediates Increased Transcription of the *phoP* Virulence Gene in a Multidrug-Resistant Clinical Isolate Responsible for Tuberculosis Outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 212–219. [[CrossRef](#)]
67. Fan, X.; Alla, A.A.E.A.; Xie, J. Distribution and function of prophage  $\phi$ Rv1 and  $\phi$ Rv2 among *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2015**, *34*, 233–238. [[CrossRef](#)]
68. Mahairas, G.G.; Sabo, P.J.; Hickey, M.J.; Singh, D.C.; Stover, C. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1274–1282. [[CrossRef](#)]
69. Lombardi, G.; Botti, I.; Pacciarini, M.L.; Boniotti, M.B.; Roncarati, G.; Monte, P.D. Five-year surveillance of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in Bologna, Italy: An underestimated problem. *Epidemiology Infect.* **2017**, *145*, 3035–3039. [[CrossRef](#)]
70. Driscoll, J.R. Spoligotyping for Molecular Epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *551*, 117–128. [[CrossRef](#)]
71. Kamerbeek, J.; Schouls, L.; Kolk, A.; van Agterveld, M.; van Soolingen, D.; Kuijper, S.; Bunschoten, A.; Molhuizen, H.; Shaw, R.; Goyal, M.; et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 907–914. [[CrossRef](#)]
72. Supply, P.; Allix, C.; Lesjean, S.; Cardoso-Oelemann, M.; Rüsche-Gerdes, S.; Willery, E.; Savine, E.; de Haas, P.; van Deutekom, H.; Roring, S.; et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 4498–4510. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 5. Les IS6110 dans les souches françaises de *M. bovis*

Ce travail a fait l'objet de :

Cinq posters:

**C Charles**, L Michelet, C Conde, M. Branger, T Cochard, F Biet, M L Boschioli. Occurrence of variable insertion sites and copy numbers of IS6110 in genomes of *Mycobacterium bovis* field strains reveal high disparity among different genetic families. Annual Scientific Meeting One Health European Joint Programme 2020. Prague, République Tchèque

**C Charles**, L Michelet, F Biet, M L Boschioli. In silico study of IS6110 sequences abundance and localisation evolution in three main *Mycobacterium bovis* French genotypes of endemic region. Annual Scientific Meeting One Health European Joint Programme 2021. Copenhague, Danemark

**C Charles**, L Michelet, F Biet, M L Boschioli. The insertion sequence IS6110 could play a role in genome plasticity of *Mycobacterium bovis* strains isolated from French bovine tuberculosis endemic regions. Journée Scientifique et Doctorale de l'ANSES 2021. Maisons-Alfort, France. Prix du meilleur poster.

**C Charles**, L Michelet, C Conde, F Biet, M L Boschioli. The insertion sequence IS6110 could play a role in genome plasticity of *Mycobacterium bovis* strains isolated from French bovine tuberculosis endemic regions. 16<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie 2021. Nantes, France.

**C Charles**, L Michelet, C Conde, F Biet, M L Boschioli. Occurrence of IS6110 copies in genomes of field strains of *Mycobacterium bovis* revealed high disparity among genetic family. 7<sup>ème</sup> congrès *M. bovis* 2022. Galway, Irlande.

Une communication orale :

**C Charles**. Occurrence of variable insertion sites and copy numbers of IS6110 in genomes of *Mycobacterium bovis* field strains reveal high disparity among different genetic families. ABIES Days 2021, Paris, France

Une publication :

**C Charles**, C Conde, F Biet, ML Boschioli and L Michelet. IS6110 Copy Number in Multi-Host *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in Bovine Tuberculosis Endemic French Regions. Front Microbiol. 2022 Jun 23;13:891902. doi: 10.3389/fmicb.2022.891902. eCollection 2022

Une précédente étude a montré une forte régionalisation de la bTB en France causée par des génotypes de *M. bovis* dans différentes régions endémiques (Hauer et al., 2019). Au total, 80 % des foyers de tuberculose en France au cours des dernières années sont dus à 3 génotypes majeurs de *M. bovis* (Delavenne et al., 2020) : le génotype SB0120-DHV (SB0120-VNTR 5 3 5 3 9 4 5 6) trouvé dans les départements de la Dordogne et de la Haute-Vienne (région Nouvelle Aquitaine) ; génotype SB0120-CO (SB0120-VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6) trouvé dans le département de la Côte-d'Or (région Bourgogne) ; génotypes de la famille Cluster A/ Famille F4 (Hauer et al., 2019), notamment en raison des génotypes SB0821/F007 et SB0832/F015 dans le département des Pyrénées Atlantiques (région Nouvelle Aquitaine) et au génotype SB0840/F001 en Corse.

La persistance de ces principaux génotypes pourrait être due à la capacité des souches à s'adapter à l'environnement. En effet, ces souches semblent se maintenir et s'étendre géographiquement malgré la mise en place de mesures de contrôle adaptées à chaque contexte (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Hauer et al., 2015).

Dans la partie précédente, il a été montré que le nombre de copies d'IS6110 pouvait varier chez *M. bovis*. Cette séquence peut jouer un rôle dans la plasticité et l'évolution du génome des mycobactéries tuberculeuses. En plus des événements de transposition et de recombinaison entre deux IS6110 (Gonzalo-Asensio et al., 2018; Mendiola et al., 1992), cette séquence contient également un promoteur constitutif fort qui dans certaines positions particulières peut entraîner la surexpression d'un gène situé en aval de la séquence d'insertion (Beggs et al., 2000; Safi et al., 2004; Sampson et al., 2003; Soto et al., 2004). Par exemple, l'insertion d'une IS6110 en amont du gène *phoP* de la souche B de *M. bovis* a provoqué une surexpression de ce gène qui a rendu la bactérie plus transmissible pour l'homme et a conduit à un important foyer de tuberculose humaine en Espagne (Gonzalo-Asensio et al., 2018; Lee et al., 2008; Soto et al., 2004; Zheng et al., 2008).

Il a été montré précédemment pour Mb1855, qui est représentatif du génotype SB0120-DHV, une présence de 12 copies d'IS6110. Ce résultat est appuyé par la présence de 11 copies dans le génome de référence de Mb3601 qui est également représentatif d'un génotype très prévalent, SB0120-CO. Il est important de mieux connaître l'impact de ce nombre de copies élevé dans le génome de ces pathogènes pour évaluer si ceux-ci pourraient apporter, tout comme dans les souches Beijing (17 copies) de *M. tuberculosis*, des changements phénotypiques leur conférant un succès épidémiologique.

Les objectifs de cette partie sont donc dans un premier temps d'étudier à l'aide d'une méthode de WGS l'abondance de copie *IS6110* et leur distribution chromosomique dans 80 souches représentatives de la diversité des génotypes français de *M. bovis*. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à la stabilité de la séquence *IS6110* et son orthologie dans des panels de souches des génotypes les plus prévalents en France évoluant dans des systèmes multi-hôtes.

### **5.1. Travaux publiés dans *Frontiers in Microbiology* :**



# IS6110 Copy Number in Multi-Host *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in Bovine Tuberculosis Endemic French Regions

Ciriac Charles<sup>1,2</sup>, Cyril Conde<sup>2</sup>, Franck Biet<sup>2†</sup>, Maria Laura Boschiroli<sup>1†</sup> and Lorraine Michelet<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup> ANSES, Animal Health Laboratory, National Reference Laboratory for Tuberculosis, Paris-Est University, Paris, France,

<sup>2</sup> INRAE, ISP, Université de Tours, Nouzilly, France

IS6110 is an insertion sequence found in the *Mycobacterium tuberculosis* complex, to which *Mycobacterium bovis* belongs, which can play a role in genome plasticity and in bacterial evolution. In this study, the abundance and location of IS6110 on *M. bovis* genomic data of French animal field strains were studied. A first analysis was performed on a panel of 81 strains that reflect the national *M. bovis* population's genetic diversity. The results show that more than one-third of them are IS6110 multicopy and that 10% have IS6110 in a high copy number (more than 6 copies). Multicopy strains are those circulating in the regions where prevalence was above the national average. Further study of 93 such strains, with an IS6110 copy number of 10-12, showed stability of IS6110 copy number and genome location over time and between host species. The correlation between *M. bovis* multicopy strains and high bovine tuberculosis (bTB) prevalence leads us to consider whether their epidemiological success could be partly due to genetic changes originated by IS6110 transposition.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis (bTB), insertion sequence (IS), IS6110, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Adrian Allen,  
Queen's University Belfast,  
United Kingdom

### Reviewed by:

Stephen V. Gordon,  
University College Dublin, Ireland  
Maxime Godfroid,  
Collège de France, France

### \*Correspondence:

Lorraine Michelet  
lorraine.michelet@anses.fr

† These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Evolutionary and Genomic  
Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 08 March 2022

**Accepted:** 03 May 2022

**Published:** 23 June 2022

### Citation:

Charles C, Conde C, Biet F,  
Boschiroli ML and Michelet L (2022)  
IS6110 Copy Number in Multi-Host  
*Mycobacterium bovis* Strains  
Circulating in Bovine Tuberculosis  
Endemic French Regions.  
*Front. Microbiol.* 13:891902.  
doi: 10.3389/fmicb.2022.891902

## INTRODUCTION

IS6110 is a specific insertion sequence of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) historically used for genotyping techniques, mainly restriction fragment length polymorphism (RFLP) IS6110, the former gold standard to identify epidemiologically linked isolates of the MTBC species (van Soolingen et al., 1994). Easier and more discriminatory methods such as spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR), and more recently, whole-genome single nucleotide polymorphism (wgSNP) have been developed (Kamerbeek et al., 1997; Supply et al., 2006; Comas et al., 2009; Driscoll, 2009; Hauer et al., 2019).

IS6110 is of particular interest due to its role in genome plasticity and bacterial evolution. In fact, this insertion sequence can promote gene inactivation and structural variation (insertion, inversion, or deletion) and can act as a mobile promoter (Soto et al., 2004; Alonso et al., 2013). As an example, the insertion of IS6110 in the *phoP* promoter has been described as the cause of gene upregulation and virulence increase of the *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) B strain, which caused severe human multidrug resistant tuberculosis outbreaks in Spain (Samper et al., 1997; Soto et al., 2004). In addition, the correlation between the high amount of IS6110 in *M. tuberculosis* Beijing lineage and its increased virulence, antibiotic resistance, and the ability of these strains to better adapt to the environment have been described (Kremer et al., 2004; McEvoy et al., 2007; Merker et al., 2013). The



number of IS6110 copies varies among MTBC members: strains belonging to the *M. tuberculosis* Beijing lineage have the most important number of IS6110 copies (15 on average), while *M. bovis* strains present only one or few copies of IS6110 (Gonzalo-Asensio et al., 2018). Nonetheless, the recent publication of a new complete genome sequence of a French field strain, *M. bovis* Mb3601, showed that this particular strain possess 11 IS6110 copies (Branger et al., 2020). This strain, which belongs to the European 3 (Eu3) complex clonal, is found in an endemic bovine tuberculosis (bTB) region (Côte d'Or in Burgundy, Central-East France) and belongs to one of the most abundant genotypes in France in the last years (Hauer et al., 2015).

Bovine tuberculosis is an old worldwide chronic zoonotic disease due to *M. bovis*. The main maintenance host species of *M. bovis* is domestic cattle but this bacterium can circulate in multi-host systems that include not only domestic but also wild animals and their environment, therefore, explaining the persistence of the pathogen in some areas (Réveillaud et al., 2018). France obtained the officially bTB free (OTF) status in 2001 (Benet et al., 2006). However, this OTF status is threatened by a steady rise of bTB cattle outbreaks over the past 15 years, partly due to more efficient surveillance in cattle and also due to the presence of wildlife infection which contributes to the persistence of the disease at regional levels.

A previous study shows a strong regionalization of bTB in France caused by specific *M. bovis* genotypes in different endemic regions (Hauer et al., 2015). Totally, 80% of bTB outbreaks in France in the last years are due to 3 major *M. bovis* genotypes (Delavenne et al., 2021): SB0120-DHV genotype (SB0120-VNTR 5 3 5 3 9 4 5 6) found in Dordogne and Haute-Vienne departments (Nouvelle Aquitaine region); SB0120-CO genotype (SB0120-VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6) found in Côte d'Or department (Burgundy region); Cluster A/F4 family genotypes (Hauer et al., 2019), especially due to SB0821/F007 and SB0832/F015 genotypes in the Atlantic Pyrenees department (Nouvelle Aquitaine region) and SB0840/F001 genotype in Corsica.

The persistence of these main genotypes could be due to the ability of the strains to adapt to the environment. In fact, these strains seem to be maintained and expand geographically despite the implementation of control measures adapted to each context (Boschioli et al., 2015; Hauer et al., 2015; Delavenne et al., 2021).

The objectives of this study were (i) to establish using a whole-genome sequencing (WGS) approach the abundance of IS6110 copy and their chromosomal distribution in 80 strains representative of French *M. bovis* genotypes diversity and (ii) to evaluate the level of the IS6110 sequence stability and their orthology in a panel of 92 sympatric strains of SB0120-CO genotype evolving in a multi-host system.

## MATERIALS AND METHODS

### Genomes of *Mycobacterium bovis* French Strains

The first panel (panel 1) constituted genomes of 80 *M. bovis* strains isolated from French bovine tuberculosis outbreaks between 1983 and 2011 which were selected from a previous

study (Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 1) (Hauer et al., 2019). DNA from bacterial clones was extracted using the phenol-chloroform method detailed in a previous study and sequenced with Illumina HiSeq technology [paired-end (2 × 100 bp)] (Hauer et al., 2019). The second panel (panel 2) constituted 92 SB0120-CO strains that have been selected from another study (Michelet et al., 2018). Bacterial thermolysates without any further purification steps were used as DNA sources. DNA sequencing was carried out with Illumina HiSeq technology [paired-end (2 × 250 bp)] (Michelet et al., 2018). These strains, isolated from the bTB endemic region in Côte d'Or (Central East France), were obtained from different animal hosts in the framework of the French bTB control campaign between 2009 and 2014 (Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 1).

The short-read quality was evaluated using FastQC (version 0.11.9 with default parameters), and reads were trimmed with Sickle<sup>1</sup> (version 1.33 with default parameters) using a quality phred-score of Q20 (Xia et al., 2016; Wingett and Andrews, 2018). The SPAdes (version 3.15.2 with careful option) tool was used to assemble short reads (Bankevich et al., 2012), and Prokka (version 1.14.6 with default parameters) was used on the genomes' assemblies (Seemann, 2014) to check the absence of contamination of the short-read sequencing. Strains of panel 2 with more than 3 rRNA or with a size between 4,200,000 and 4,600,000 base pairs were considered for further analyses.

### Phylogenetic Analysis

Single nucleotide polymorphisms were obtained using the Bionumerics software, version 7.6 (AppliedMath, Belgium). Identified SNPs were selected according to strict criteria of the wgSNP module as follows: they had to be present on at least five reads in both forward and reverse directions, twelve base pairs had to separate them, they were not present in repetitive regions of the genome, and ambiguous SNPs [at least one unreliable (N) base, ambiguous (non-ATCG) base, or gap] were not included. The evolutionary trees were inferred on Mega (Kumar et al., 2016) using the maximum likelihood method (Hasegawa–Kishino–Yano model) based on concatenated and validated SNPs (panel 1, 8,981 SNPs for 81 genomes; panel 2, 124 SNPs for 93 genomes). The trees were drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

### IS6110 Distribution Analysis

ISMMapper (version 2.0.1) pipeline (Hawkey et al., 2015) was carried out in this study for IS6110 identification on genome short-read sequences using Mb3601 reference genome (Branger et al., 2020). The employed script is available on GitHub.<sup>2</sup> To achieve 100% detection with high confidence, average genome-wide read depths of < 75 × were excluded for panel 2 strains (Hawkey et al., 2015). Only 93 genomes (with Mb3601 reference

<sup>1</sup><https://github.com/najoshi/sickle>

<sup>2</sup>[https://github.com/jhawkey/IS\\_mapper](https://github.com/jhawkey/IS_mapper)



strains) out of the initial 147 passed the quality selection described in this and the previous section.

For uncertain IS6110 presence and/or localization (37 and 9 uncertain insertion sites in panel 1 and panel 2, respectively) due to low read depth in the IS insertion site, IS6110 presence was manually checked with Integrative Genomics Viewer (Robinson et al., 2011) using the bam file generated by ISMapper.

## Orthology Analysis

Genomic positions were deduced through ISMapper analysis. Surrounding genes (other than IS6110) of these insertion sites were identified based on Mb3601 reference to determine orthologous genomic sites of the IS. Insertion sites present in the same coding sequence (CDS) are grouped in a common locus.

## IS6110 Site Gene Ontology Enrichment Analysis

Gene ontology (GO) analysis was performed on the upstream and downstream genes of IS6110 using their protein sequence. Functional annotation was performed using eggNOG 5.0 (Huerta-Cepas et al., 2019). Specific colors were applied to the gene according to their Cluster of Orthologous Gene (COG) functional categories.

## RESULTS

### IS6110 Abundance in *Mycobacterium bovis* French Diversity

Among the 81 *M. bovis* strains representing the French genotypic diversity of panel 1, 65% (53/81) have only one IS6110 copy, 25% (20/81) are IS6110 low copy number (2–5 IS6110 copies), and 10% (8/81) present a high copy number with more than six copies (**Figure 1** and **Supplementary Table 1**) (Fomukong et al., 1998; Gonzalo-Asensio et al., 2018). Among the different clusters described by Hauer and collaborators (Hauer et al., 2019), strains of Cluster C (SB0134) and those of the European 1 clonal complex (Smith et al., 2011) are mostly single copies, except for one strain in each cluster with two and three copies (B7 and D6, respectively). F9 family/cluster G strains are all IS6110 single copies. The IS6110 copy number seems to be correlated with the phylogenetic group (cluster or subcluster). All strains in Cluster A/F4 family group are IS6110 multicopy with three common insertions, which are present in most of the strains belonging to this cluster (8/10). Among the 14 strains that belong to the European 2 (Eu2) clonal complex (Rodriguez-Campos et al., 2012), 43% of them (6/14), which are localized on two specific branches of the phylogenetic tree, possess more than one IS6110 copy (3–5 copies). Notably, 31% of Eu3 clonal complex strains (9/29), including the Mb3601, are IS6110 multicopy. This group includes the strain with the highest IS6110 copy number, i.e., 16 copies, strain A5. Interestingly, these high copy number strains (7–16 copies) are all present in a specific monophyletic clade (8/8). Strains that have caused the majority of outbreaks in France in the last 10 years belong to strain groups, which are multicopy, with a low copy number of 2–5 copies for Cluster

A/F4 family and a high copy number of 11–13 copies for SB0120-DHV and SB0120-CO.

In the 81 strains of panel 1, 58 insertion sites have been identified (insertion sites 1 to 58 related to position on the genome Mb3601) and are summarized in **Supplementary Table 2**. Almost 50% of these insertion sites (28/58) are only observed in a unique strain. Almost all these strains possess an IS6110 insertion in the Direct Repeat (DR) locus (position 43). However, this insertion is absent in two Cluster A/F4 family strains: D5, with an SB0840 spoligotype and D12 with a SB0928 spoligotype. Strain D12 has an IS6110 insertion in position 42, also observed in strain D3 which is phylogenetically close to strain D12. In addition to the number of copies, which seems to be related to certain strain groups, the localization of these insertions also seems to be conserved. For instance, Cluster A/F4 family strains have 3 common IS6110 insertion sites (insertion sites 1, 33, and 43). Eight of these insertion sites are shared between several *M. bovis* groups. For example, insertion site 33 is common between Cluster A/F4 family (10 strains) and SB0120-CO genotype (2 strains), and insertion sites 19 and 50 are both shared by 7 strains of three different clonal groups.

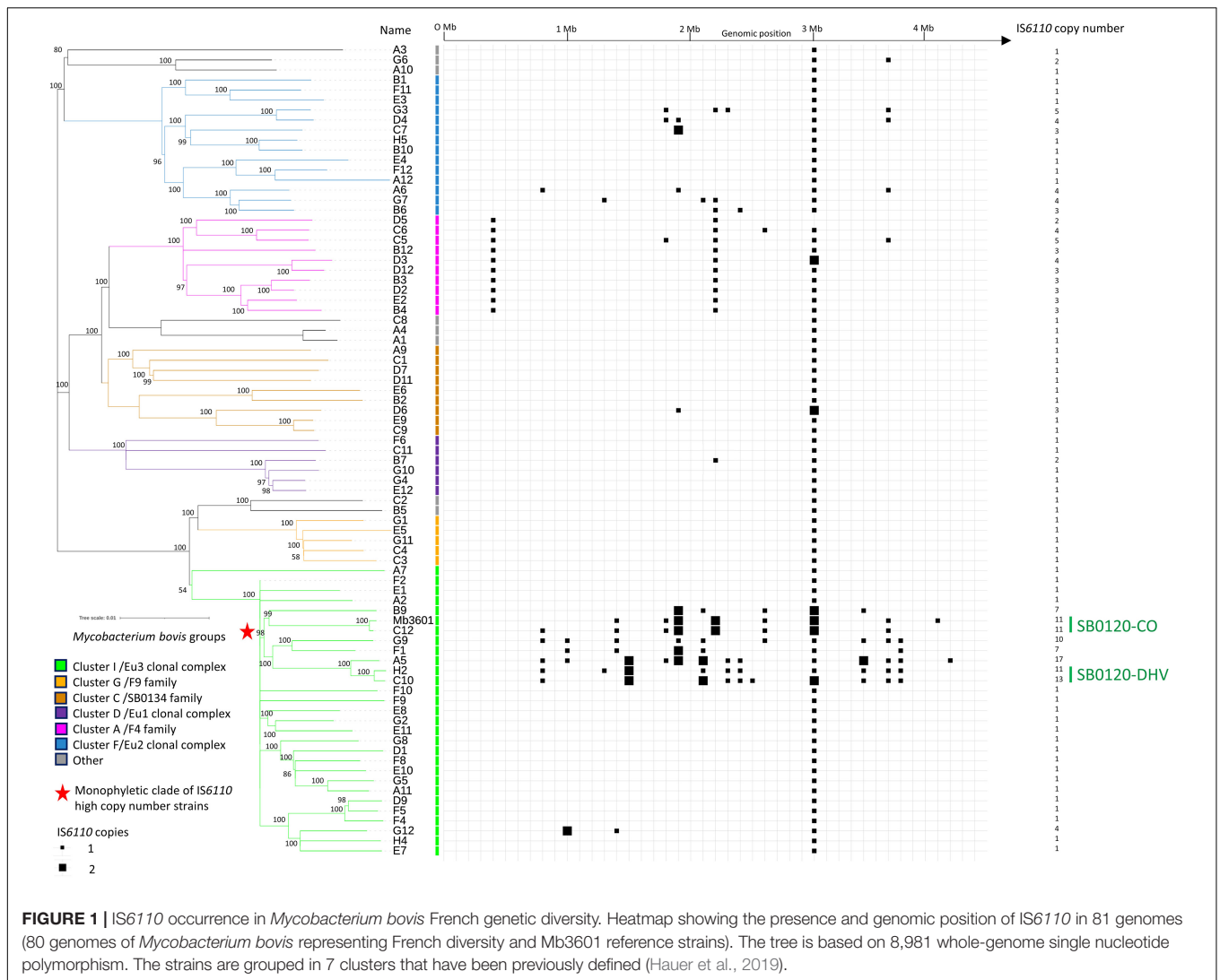
SB0120-DHV genotype strains (strains H2 and C10) and the SB0120-CO genotype (strains C12 and Mb3601) strains have each 10 IS6110 conserved insertion sites, but only two of them (insertion sites 43 and 50) are common to the four strains. Strain A5, phylogenetically closely to SB0120-DHV, has also these ten IS6110 insertion sites but also shares a common insertion site (insertion site 19) with strains belonging to the monophyletic clade of IS6110 high multicopy strains (SB0120-CO, F1, and B9 strains).

### Longitudinal Study of IS6110 in Sympatric Strains

To further study the IS6110 high copy number phenomenon in *M. bovis* strains, IS6110 sites were searched in a panel of multicopy strains of the SB0120-CO genotype. The studied panel, panel 2, is composed of strains isolated over a period of 6 years and from four different species [cattle, badger (*Meles meles*), wild boar (*Sus scrofa*), and fox (*Vulpes vulpes*)]. SB0120-CO strains possess between 10 and 12 IS6110 copies (**Figure 2** and **Supplementary Table 3**). These insertion sites are stable over time; in fact, ten of them are found in all SB0120-CO strains of panel 1 and panel 2 (**Figures 1, 2**). Furthermore, IS6110 genomic positions are also conserved independently of the animal species from which the strains were isolated. Eight other IS6110 genomic positions exist but are unique to a specific strain. One of them is present in 3 very close SB0120-CO strains. Besides, SB0120-CO strains with an additional insertion are present on different branches of the tree. These insertions are neither recurrent in our sampling nor conserved over time or correlated to host adaptation.

### Genetic Impact of the IS6110 Insertions

The analysis of IS6110 genomic positions in the *M. bovis* French diversity (panel 1) revealed 58 insertion loci and shows that

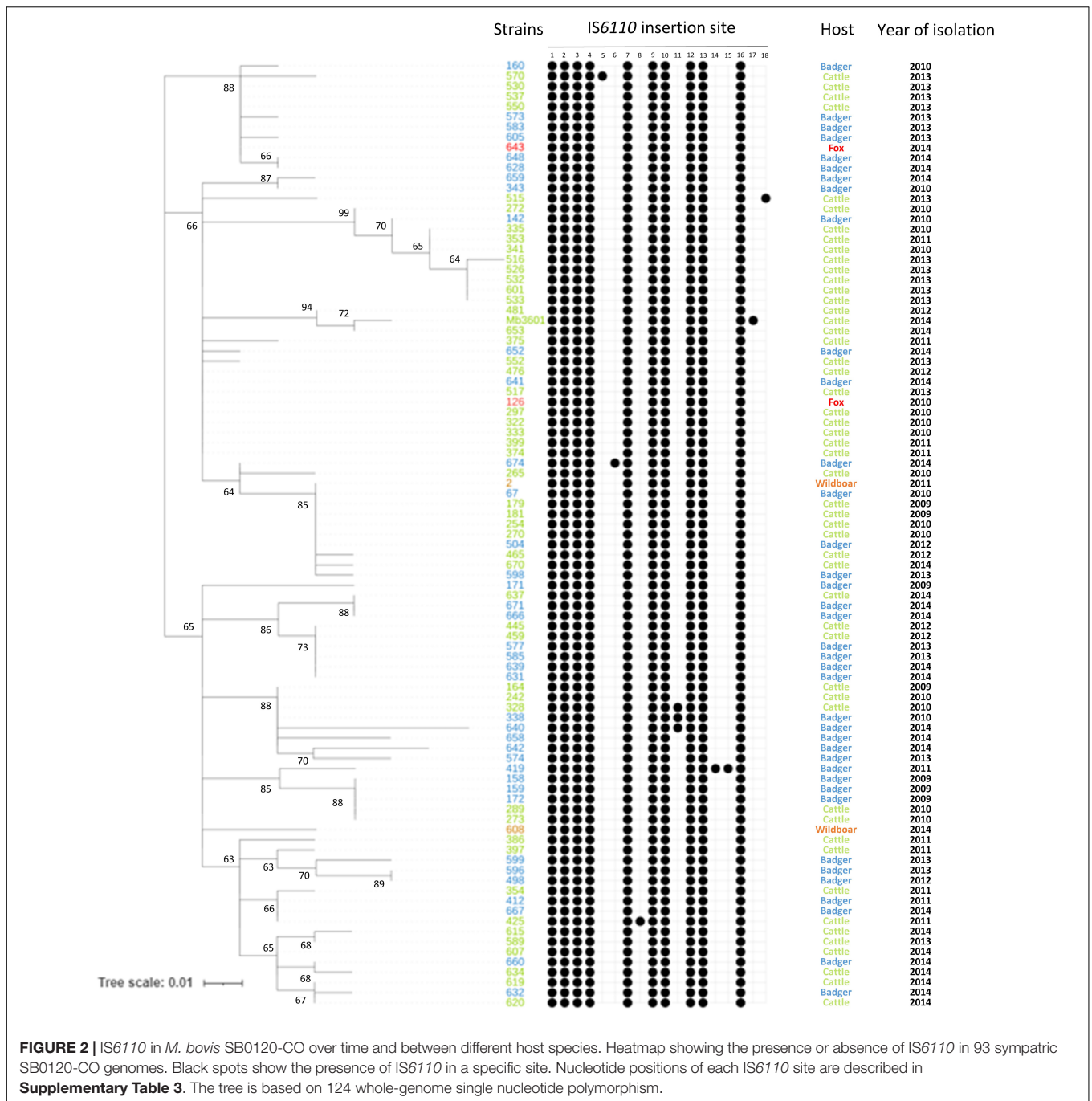


62% of them are intragenic (36/58) (**Supplementary Table 2**). Of the 36 intragenic insertions, 7 are present in Mb3601, and their identities are confirmed with blast alignment on AF2122/97 reference genome (data not shown). However, the proportion of intragenic IS6110 sites is different in several groups according to different IS6110 copy numbers.

A schematic representation of insertion sites (**Supplementary Table 4**) shows that some IS6110 insertion sites can be localized in different positions and orientations in the same insertion region such as in the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-associated (CRISPR-Cas) region, near the MBS3601\_RS09105 locus or near the MBS3601\_RS05055 locus.

The intragenic insertions are mostly found in Cluster A/F4 family, Cluster F/Eu2 clonal complex, and Cluster I/Eu3 clonal complex strains which can be explained by the presence of several copies of IS6110 in these groups (**Supplementary Table 2**). Analyses of the genes interrupted by IS6110 in the 3 most representative French *M. bovis* types defined previously, i.e.,

SB0120-CO, SB0120-DHV, and Cluster A/F4 family, show genes associated with 10 gene ontology pathways. Most genes interrupted by IS6110 in Cluster A/F4 family and SB0120-CO strains have unknown, and “Replication, recombination and repair” functions but also “Coenzyme transport and metabolism,” “Defense mechanisms,” “Energy production and conversion,” and “Cell wall/membrane/envelope biogenesis” function in SB0120-CO. These functions are not found in SB0120-DHV, where genes involved in “Cell motility” and “Transcription” functions are those presenting the most interruptions. These insertion sites in specific genes can be conserved in the same *M. bovis* cluster such as *rpfD*, *moeY*, and *cas1* for SB0120-CO, MB3601\_RS02050 (hyaluronidase/chondrosulfatase) for Cluster A/F4 family, or MBS3601\_RS11780 (*LysR* family transcriptional regulator) and MBS3601\_RS16315 (PPE family protein) for SB0120-DHV. Some other genes can be interrupted in several *M. bovis* clusters such as *radD* (12 strains from 2 different clusters) or *plcD* (7 strains from 3 different clusters). However, further study on these insertion sites shows the difference in genomic

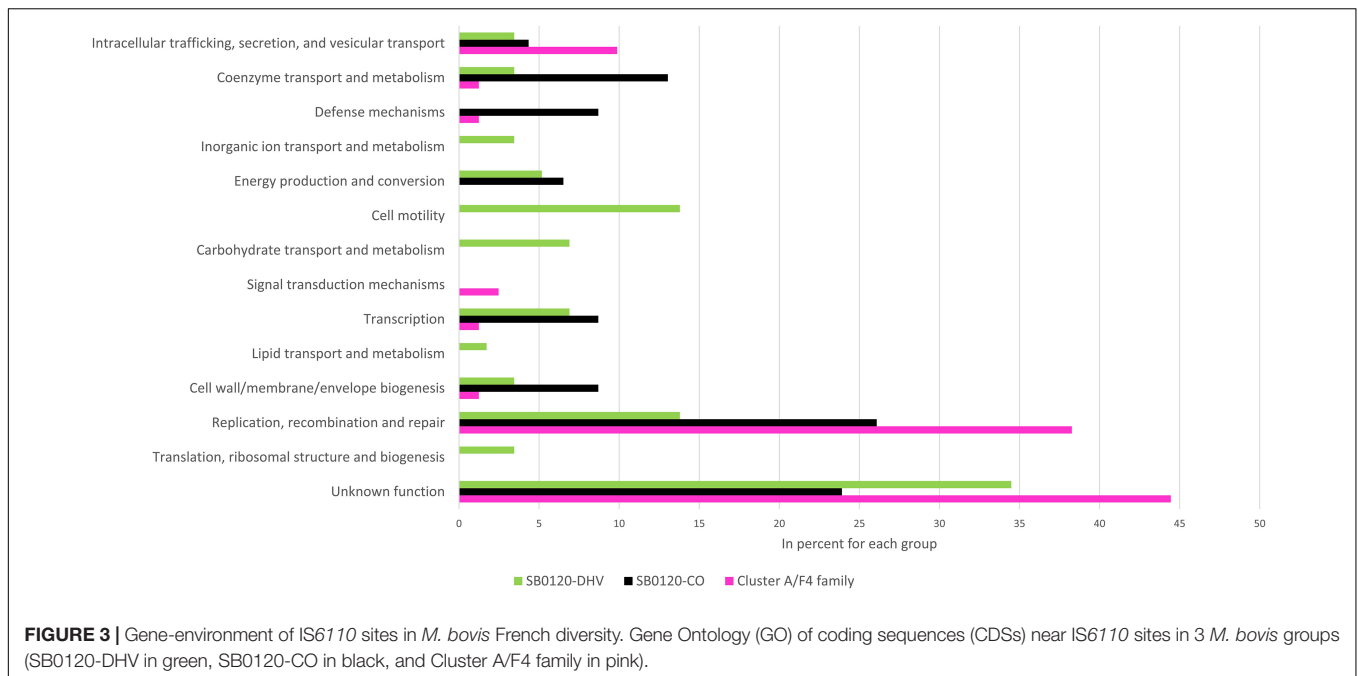


position and/or in IS orientation among *M. bovis* clusters (**Supplementary Tables 2, 4**).

A total of 13 GO pathways present in upstream or downstream of IS6110 insertion loci in SB0120-CO, SB0120-DHV, and Cluster A/F4 family could be highlighted (**Figure 3**). Most of these genes are associated with an unknown function GO category. The “Replication, recombination and repair” GO category is the most frequently represented category with a determined function in the three groups, with 38% (31/81) in Cluster A/F4 family, 26% (12/46) in SB0120-CO, and 14% (8/58) SB0120-DHV.

## DISCUSSION

*Mycobacterium bovis* strains are commonly considered as possessing one or few copies of IS6110 (Gonzalo-Asensio et al., 2018), and only few strains were described as IS6110 multicopy (Soto et al., 2004; Allix et al., 2006; Gonzalo-Asensio et al., 2018; Branger et al., 2020). However, our study focusing on French *M. bovis* diversity shows that more than one-third of our samples are multicopy. Specifically, strains of Cluster A/F4 family, SB0120-CO and SB0120-DHV genotypes, which are



those circulating in the most bTB prevalent regions in the past 10 years (Delavenne et al., 2021), are IS6110 multicopy. This observation leads us to consider whether IS6110 transposition could be partly responsible for their epidemiological success, although other explanations could support this success, notably the drop in strain diversity (Boschiroli et al., 2015; Hauer et al., 2015; Delavenne et al., 2021) and the associated bottleneck following the establishment of control programs. Moreover, other genetic events can also contribute to the success of these strains (indel, SNP). Further analyses are needed to combine SNP and deletion events as well as IS6110 transposition events.

Strains with the highest IS6110 copy numbers belong to the Eu3 clonal complex and in particular to a specific monophyletic clade in the phylogenetic tree to which the two monophyletic types SB0120-CO and SB0120-DHV belong. *In silico* results describing the presence of IS6110 high copy number strains in the same monophyletic clade are sustained by the description of the 11 IS6110 copies in the Mb3601 complete genome (Branger et al., 2020) and that of strain F1 (7 IS6110 copies). F1 is characterized by spoligotype SB0162 (Supplementary Table 1) and found not only in France but also in Belgium and previously described by IS6110 RFLP analysis as presenting 8–11 copies, which is close to our results (Allix et al., 2006).

According to the results on SB0120-CO sympatric strains, IS6110 copy number and insertion site seem to be stable over time among this type of strain, with an average of 10 copies and recurrence in their genomic positions. Furthermore, a specific host adaptation through IS6110-linked changes does not seem to have taken place as suggested for highly epidemic *M. tuberculosis* strains (Beijing lineage) (Gonzalo-Asensio et al., 2018), given that no strain variability is observed, neither on

the copy number nor in IS6110 insertion site, independently of the different animal hosts from which the strains were isolated from. This high stability over time and independently of the affected animal species demonstrates that *M. bovis* strains do not seem to evolve *via* IS6110 transposition for specific host adaptation as suggested by Gonzalo-Asensio et al. (2018). Both this stability and independence of the animal host were also confirmed in IS6110 multicopy SB0120-DHV and Cluster A/F4 family strains of SB0821 and SB0832 spoligotypes, and also in SB0134 single-copy strains infecting livestock and wildlife in several regions in France (data not shown). Furthermore, the stability of the 3 common IS6110 sites in Cluster A/F4 family strains suggests the evolution of these strains from a common ancestor. However, if the genotypes SB0120-CO and SB0120-DHV have each 10 conserved insertion sites, only 2 are common between the two types. As expected, one of them is present in the DR locus (insertion 43). The second one (insertion 50) is present in an IS6110 Preferential Locus (ipl) region which is described to be a hotspot of IS6110 (Fang and Forbes, 1997; Roychowdhury et al., 2015). In fact, this insertion is also present in strains of the other groups such as Cluster A/F4 family and Eu2 clonal complex.

As expected, almost all strains in our panel (79 out of 81) have the IS6110 in the DR locus. This insertion site is common to most MTBC species and is defined as the ancestral insertion of a common ancestor (Hermans et al., 1990; Dale, 1995; Philipp et al., 1996; Thorne et al., 2011; Gonzalo-Asensio et al., 2018). MTBC that lacks the DR IS6110 has previously been described (Refrégier et al., 2020) and may be explained by recombination events between two IS6110 and IS transpositions (Gonzalo-Asensio et al., 2018; Shitikov et al., 2019; Refrégier et al., 2020).



The specific insertion in several genes such as *moeY* in SB0120-CO strains or *radD* in Cluster A/F4 family and SB0120-DHV strains shows that their expression is not essential for bacterial virulence and transmission given that these genotypes are prevalent in France (Delavenne et al., 2021).

IS6110 is often inserted in the environment of genes implied in “replication, recombination and repair,” “transcription,” “cell wall/membrane/envelope biogenesis,” and “coenzyme transport and metabolism pathways” GO categories according to the literature (Reyes et al., 2012). These four categories are also the most frequently identified in our analysis. In fact, 21% (78/369) of genes around IS6110 insertion sites of multicopy strains are involved in the “replication, recombination and repair” GO category. This category with a determined function is the most frequent in our analysis. Genes encoding replication, recombination, and DNA repair functions seem to play an important role in the evolution of highly clonal bacteria such as *M. bovis* (Vultos et al., 2008; Mestre et al., 2011; Reis et al., 2021). Other frequent categories are “Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport” (7%, 26/369), “Cell wall/membrane/envelope biogenesis” (6%, 22/369), and “Transcription” (6%, 22/369) or “Cell motility” (5%, 20/369). IS6110 insertions in or near these genes could play a role in *M. bovis* genome plasticity.

New IS6110 insertion sites in *M. bovis* genomes have been described in this study, especially in SB0120-CO, SB0120-DHV, Cluster A/F4 family, and Cluster F/Eu2 clonal complexes such as insertion site 15 interrupting *cmr* gene or insertion site 24 interrupting *cyp144* gene. Some IS6110 insertion sites have already been described in other MTBCs, suggesting that an *ipl* region could be common to several MTBC species. For example, the ancestral IS6110 is present in almost all MTBC strains, and some other IS6110 can be found in the CRISPR-Cas region (Hermans et al., 1990; Thorne et al., 2011; Refrégier et al., 2020). Moreover, the 3 insertion sites highlighted in our study that are common to several clusters have already been described as *ipl* in previous studies: the *plcD* region (insertion site 19) (Gordon et al., 1999; Sampson et al., 1999; Viana-Niero, 2006; Roychowdhury et al., 2015), insertion site 33 around *radD* (Chen et al., 2015), and insertion site 50 around IS1547 (Fang et al., 1999) (Supplementary Table 2). The result gene regulation of IS6110 insertion in these hot spots can be different depending on the IS6110 orientations and/or insertion sites in the same genomic region and can lead to gene interruption or expression regulation (Sampson et al., 1999; Warren et al., 2000; Vera-Cabrera et al., 2001; Soto et al., 2004; Kim et al., 2010).

As expected, given that our strains are issued from well-established infected animals, IS6110 insertion sites were not identified in genes previously described as essential for virulence (Sasseti and Rubin, 2003; Forrellad et al., 2013). However, some genes shown in our study as being interrupted by IS6110, such as *plcD*, were described as conferring an increased virulence for thoracic tuberculosis and a role in bacterial persistence within macrophages (Raynaud et al., 2002; Kong et al., 2005; Forrellad et al., 2013). Nonetheless, and in line with the fact that the strains in our study were infectious to animals from which they were

isolated, other authors suggested that PLCs could play a less important role in bacterial virulence (Le Chevalier et al., 2015). However, genes such as *plcD* and *rpfD* have homologous genes, and their inactivation could be overcome by other homolog genes as reported by Kana and collaborators for *rpf* genes (Raynaud et al., 2002; Kana et al., 2008; Shafipour et al., 2021).

IS6110 can also lead to gene regulation *via* its strong promoter as observed in the B strain on *phoP*. This insertion upstream of this essential gene for virulence probably led the strain to adapt to the human host and provoked an important multidrug-resistant (MDR) tuberculosis outbreak due to *M. bovis* (Soto et al., 2004). No such IS6110 insertion leading to *phoP* regulation was found in our study. Some studies suggest that IS6110 inserted no more than 400 bp upstream of a gene and in the same transcriptional orientation may upregulate its expression (Safi et al., 2004; Soto et al., 2004; Alonso et al., 2013). Such type of insertions has been detected in our analyses (data not shown). However, as they deserve complementary *in vivo* or *in vitro* studies with the corresponding strains, we cannot assess if they play any role on virulence or other survival traits.

## CONCLUSION

Contrary to what was expected from the literature, this study shows that 35% of the strains representative of the French diversity possess more than one IS6110. In addition, 10% that belong to a specific monophyletic clade of the Eu3 clonal complex present a high IS6110 copy number. These multicopy strains are those circulating in French regions where bTB is most prevalent. IS6110 insertion sites appear to be stable within specific genotypes over time and between host species, suggesting that IS6110 transposition is not an evolutionary driver for modern French *M. bovis* strains at least over a 15-year period. Moreover, the correlation between the epidemiological success of *M. bovis* strains and multicopies of IS6110 leads us to consider whether it could be the consequence of an increase in their fitness due to the genetic changes originated by IS6110 transposition which could have occurred during ancient evolutionary diversification events. Any phenotypical consequence of IS6110 insertions should need confirmation by *in vitro* or *in vivo* experiment.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM, MLB, and FB supervised this study. CCh performed bioinformatics work and wrote the first draft. CCo provided bioinformatics support for data analysis. All authors contributed to this study correction, discussed the results and their interpretation, and approved the submitted version.

## FUNDING

CCh is a doctoral fellow financed by the ANSES and the One Health European Joint Programme (OHEJP), Grant number 773830.

## REFERENCES

- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., and Fauville-Dufaux, M. (2006). Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1951–1962. doi: 10.1128/JCM.01775-05
- Alonso, H., Samper, S., Martín, C., and Otal, I. (2013). Mapping IS6110 in high-copy number *Mycobacterium tuberculosis* strains shows specific insertion points in the Beijing genotype. *BMC Genomics* 14:422. doi: 10.1186/1471-2164-14-422
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Benet, J.-J., Boschioli, M.-L., Dufour, B., and Garin-Bastuji, B. (2006). Lutte contre la tuberculose bovine en France de 1954 à 2004: Analyse de la pertinence épidémiologique de l'évolution de la réglementation. *Epidémiol et santé anim.* 1, 127–143.
- Boschioli, M.-L., Michelet, L., Hauer, A., De Cruz, K., Courcou, A., Hénault, S., et al. (2015). Tuberculose bovine en France : cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000-2013. *Bull. Épidémiol. santé animale alimentation.* 70, 2–8.
- Branger, M., Loux, V., Cochard, T., Boschioli, M. L., Biet, F., and Michelet, L. (2020). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* Mb3601, a SB0120 spoligotype strain representative of a new clonal group. *Infect. Gene. Evol.* 1:104309. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104309
- Chen, S. H., Byrne, R. T., Wood, E. A., and Cox, M. M. (2015). *Escherichia coli* radD (yejH) gene: a novel function involved in radiation resistance and double-strand break repair. *Mol. Microbiol.* 95, 754–768. doi: 10.1111/mmi.12885
- Comas, I., Homolka, S., Niemann, S., and Gagneux, S. (2009). Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLoS One* 4:e7815. doi: 10.1371/journal.pone.0007815
- Dale, J. W. (1995). Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur. Respir. J. Suppl.* 20, 633s–648s.
- Delavenne, C., Desvaux, S., Boschioli, M.-L., Carles, S., Durand, B., and Forfait, C. (2021). Surveillance de la tuberculose due à *Mycobacterium bovis* en France métropolitaine en 2019: Résultats et indicateurs de fonctionnement. *Bull. Épidémiol. Santé Animale Alimentation* 94, 1–23.
- Driscoll, J. R. (2009). “Spoligotyping for Molecular Epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex,” in *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*, ed. D. A. Caugant (Totowa, NJ: Humana Press), 117–128. doi: 10.1007/978-1-60327-999-4\_10
- Fang, Z., Doig, C., Morrison, N., Watt, B., and Forbes, K. J. (1999). Characterization of IS1547, a New Member of the IS900 Family in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, and Its Association with IS6110. *J. Bacteriol.* 181, 1021–1024. doi: 10.1128/JB.181.3.1021-1024.1999
- Fang, Z., and Forbes, K. J. (1997). A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (ipl) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.* 35, 479–81. doi: 10.1128/jcm.35.2.479-481.1997
- Fomukong, N., Beggs, M., El Hajj, H., Templeton, G., Eisenach, K., and Cave, M. D. (1998). Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tubercle Lung Dis.* 78, 109–116. doi: 10.1016/s0962-8479(98)80003-8
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Garcia, J. S. Y., Morbidoni, H. R., Santangelo, M., et al. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 4, 3–66.
- Gonzalo-Asensio, J., Pérez, I., Aguiló, N., Uranga, S., Picó, A., Lampreave, C., et al. (2018). New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages. *PLoS Genet.* 14:e1007282. doi: 10.1371/journal.pgen.1007282
- Gordon, S. V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., and Cole, S. T. (1999). Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32, 643–655. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01383.x
- Hauer, A., De Cruz, K., Cochard, T., Godreuil, S., Karoui, C., Henault, S., et al. (2015). Genetic Evolution of *Mycobacterium bovis* Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978. *PLoS One* 10:e0117103. doi: 10.1371/journal.pone.0117103
- Hauer, A., Michelet, L., Cochard, T., Branger, M., Nunez, J., Boschioli, M.-L., et al. (2019). Accurate Phylogenetic Relationships Among *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in France Based on Whole Genome Sequencing and Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Front Microbiol.* 10:955. doi: 10.3389/fmicb.2019.00955
- Hawkey, J., Hamidian, M., Wick, R. R., Edwards, D. J., Billman-Jacobe, H., Hall, R. M., et al. (2015). ISMapper: identifying transposase insertion sites in bacterial genomes from short read sequence data. *BMC Genomics* 16:667. doi: 10.1186/s12864-015-1860-2
- Hermans, P. W., van Soolingen, D., Dale, J. W., Schuitema, A. R., McAdam, R. A., Catty, D., et al. (1990). Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2051–2058. doi: 10.1128/jcm.28.9.2051-2058.1990
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., et al. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* 47, D309–D314. doi: 10.1093/nar/gky1085
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., et al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907–914. doi: 10.1128/jcm.35.4.907-914.1997
- Kana, B. D., Gordhan, B. G., Downing, K. J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E. E., et al. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol. Microbiol.* 67, 672–684. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06078.x
- Kim, E. Y., Nahid, P., Hopewell, P. C., and Kato-Maeda, M. (2010). Novel Hot Spot of IS6110 Insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1422–1424. doi: 10.1128/JCM.02210-09
- Kong, Y., Cave, M. D., Yang, D., Zhang, L., Marrs, C. F., Foxman, B., et al. (2005). Distribution of Insertion- and Deletion-Associated Genetic Polymorphisms among Four *Mycobacterium tuberculosis* Phospholipase C Genes and Associations with Extrathoracic Tuberculosis: a Population-Based Study. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6048–6053. doi: 10.1128/JCM.43.12.6048-6053.2005
- Kremer, K., Glynn, J. R., Lillebaek, T., Niemann, S., Kurepina, N. E., Kreiswirth, B. N., et al. (2004). Definition of the Beijing/W Lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the Basis of Genetic Markers. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4040–4049. doi: 10.1128/JCM.42.9.4040-4049.2004
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Le Chevalier, F., Cascioferro, A., Frigui, W., Pawlik, A., Boritsch, E. C., Bottai, D., et al. (2015). Revisiting the role of phospholipases C in virulence and the lifecycle of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.* 5:16918. doi: 10.1038/srep16918
- McEvoy, C. R. E., Falmer, A. A., van Pittius, N. C. G., Victor, T. C., van Helden, P. D., and Warren, R. M. (2007). The role of IS6110 in the evolution of

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.891902/full#supplementary-material>

- Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 87, 393–404. doi: 10.1016/j.tube.2007.05.010
- Merker, M., Kohl, T. A., Roetzer, A., Truebe, L., Richter, E., Rüscher-Gerdes, S., et al. (2013). Whole Genome Sequencing Reveals Complex Evolution Patterns of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in Patients. *PLoS One* 8:e82551. doi: 10.1371/journal.pone.0082551.
- Mestre, O., Luo, T., Vultos, T. D., Kremer, K., Murray, A., Namouchi, A., et al. (2011). Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains Constructed from Polymorphisms in Genes Involved in DNA Replication, Recombination and Repair. *PLoS One* 6:e16020. doi: 10.1371/journal.pone.0016020
- Michelet, L., Courcou, A., Durand, B., and Boschirol, M. L. (2018). Reconstitution of *Mycobacterium bovis* transmission chain between cattle and wild animals. *Épidémiologie .Santé Animale* 2018, 81–90.
- Philipp, W. J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., et al. (1996). An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *PNAS* 93, 3132–3137. doi: 10.1073/pnas.93.7.3132
- Raynaud, C., Guillhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganeli, R., et al. (2002). Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 45, 203–217. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03009.x
- Refrégier, G., Sola, C., and Guyeux, C. (2020). Unexpected diversity of CRISPR unveils some evolutionary patterns of repeated sequences in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Genom.* 21:841. doi: 10.1186/s12864-020-07178-6
- Reis, A., Salvador, L., Robbe-Austerman, S., Tenreiro, R., Botelho, A., Albuquerque, T., et al. (2021). Whole Genome Sequencing Refines Knowledge on the Population Structure of *Mycobacterium bovis* from a Multi-Host Tuberculosis System. *Microorganisms* 26:9. doi: 10.3390/microorganisms9081585
- Réveillaud, É., Desvaux, S., Boschirol, M.-L., Hars, J., Faure, É., Fediaevsky, A., et al. (2018). Infection of Wildlife by *Mycobacterium bovis* in France Assessment Through a National Surveillance System, Sylvatub. *Front Vet Sci.* 5:262. doi: 10.3389/fvets.2018.00262
- Reyes, A., Sandoval, A., Cubillos-Ruiz, A., Varley, K. E., Hernández-Neuta, I., Samper, S., et al. (2012). IS-seq: a novel high throughput survey of in vivo IS6110 transposition in multiple *Mycobacterium tuberculosis* genomes. *BMC Genomics.* 13:249. doi: 10.1186/1471-2164-13-249
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., et al. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26.
- Rodríguez-Campos, S., Schürch, A. C., Dale, J., Lohan, A. J., Cunha, M. V., Botelho, A., et al. (2012). European 2 – A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infect. Genet. Evol.* 12, 866–872. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.004
- Roychowdhury, T., Mandal, S., and Bhattacharya, A. (2015). Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.* 5:12567 doi: 10.1038/srep12567
- Safi, H., Barnes, P. F., Lakey, D. L., Shams, H., Samten, B., Vankayalapati, R., et al. (2004). IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 52, 999–1012. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04037.x
- Samper, S., Martín, C., Pinedo, A., Rivero, A., Blázquez, J., Baquero, F., et al. (1997). Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS* 11, 1237–42. doi: 10.1097/00002030-199710000-00006
- Sampson, S. L., Warren, R. M., Richardson, M., van der Spuy, G. D., and van Helden, P. D. (1999). Disruption of coding regions by IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung. Dis.* 79, 349–359. doi: 10.1054/tuld.1999.0218
- Sassetti, C. M., and Rubin, E. J. (2003). Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *PNAS* 100, 12989–12994.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Shafipour, M., Shirzad-Aski, H., Kochaksaraei, M. B., Sohrabi, A., Taziki, M., Mahghani, G. A., et al. (2021). The Prevalence of plcD Gene and Evaluation of IS6110 Insertion Status in This Gene in Some Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Mol. Gene. Microbiol. Virol.* 36.111–118
- Shitikov, E., Guliaev, A., Bespyatykh, J., Malakhova, M., Kolchenko, S., Smirnov, G., et al. (2019). The role of IS6110 in micro- and macroevolution of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 2. *Mol. Phylogenetics Evol.* 139:106559. doi: 10.1016/j.ympev.2019.106559
- Smith, N. H., Berg, S., Dale, J., Allen, A., Rodriguez, S., Romero, B., et al. (2011). European 1: A globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1340–1351. doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.027
- Soto, C. Y., Menendez, M. C., Perez, E., Samper, S., Gomez, A. B., Garcia, M. J., et al. (2004). IS6110 Mediates Increased Transcription of the phoP Virulence Gene in a Multidrug-Resistant Clinical Isolate Responsible for Tuberculosis Outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 42, 212–219. doi: 10.1128/JCM.42.1.212-219.2004
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., et al. (2006). Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4498–4510.
- Thorne, N., Borrell, S., Evans, J., and Magee, J. (2011). Garcia de Viedma D, Bishop C, et al. IS6110-based global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Genetics Evol.* 11, 132–138. doi: 10.1016/j.meegid.2010.09.011
- van Soolingen, D., de Haas, P. E., Haagsma, J., Eger, T., Hermans, P. W., Ritacco, V., et al. (1994). Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2425–2433. doi: 10.1128/jcm.32.10.2425-2433.1994
- Vera-Cabrera, L., Hernández-Vera, M. A., Welsh, O., Johnson, W. M., and Castro-Garza, J. (2001). Phospholipase Region of *Mycobacterium tuberculosis* Is a Preferential Locus for IS6110 Transposition. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3499–3504. doi: 10.1128/JCM.39.10.3499-3504.2001
- Viana-Niero, C. (2006). Identification of an IS6110 insertion site in plcD, the unique phospholipase C gene of *Mycobacterium bovis*. *J. Med. Microbiol.* 55, 451–457. doi: 10.1099/jmm.0.46364-0
- Vultos, T. D., Mestre, O., Rauzier, J., Golec, M., Rastogi, N., Rasolof, V., et al. (2008). Evolution and Diversity of Clonal Bacteria: The Paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 3:e1538. doi: 10.1371/journal.pone.0001538
- Warren, R. M., Sampson, S. L., Richardson, M., Spuy, G. D. V. D., Lombard, C. J., Victor, T. C., et al. (2000). Mapping of IS6110 flanking regions in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* demonstrates genome plasticity. *Mol. Microbiol.* 37, 1405–1416. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02090.x
- Wingett, S. W., and Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res* 7:1338 doi: 10.12688/f1000research.15931.2
- Xia, E., Teo, Y.-Y., and Ong, R. T.-H. (2016). SpoTyping: fast and accurate in silico *Mycobacterium* spoligotyping from sequence reads. *Genome Med.* 8:19. doi: 10.1186/s13073-016-0270-7

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Charles, Conde, Biet, Boschirol and Michelet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Des analyses complémentaires ont été réalisées sur deux autres panels de souches sympatriques des génotypes SB0821/F007 - SB0832/F015 et du génotype SB0120-DHV afin de confirmer les observations faites sur le panel de SB0120-CO.

Une analyse plus précise de la région DR a également été réalisée sur le panel des 80 souches (panel 1).

## **5.2. Étude complémentaire dans 2 panels de souches sympatriques**

Afin de confirmer le niveau de stabilité de la séquence d'*IS6110*, une étude de l'évolution du nombre et de leur position au cours du temps a été réalisée dans deux panels supplémentaires de souches issues de différentes espèces animales dans des périodes de temps allant de 16 à 17 années de génotypes responsables de la majorité des foyers de bTB en France : SB0821/F007 - SB0832/F015 (panel 4) et SB1020-DHV(panel 3) (Delavenne et al., 2020; Duault et al., 2022).

### **5.2.1. Génotypes SB0821/F007 et SB0832/F015**

Sur ce panel de 187 souches, 8 sites d'insertion d'*IS6110* ont été identifiés dont 3 récurrents dans toutes les souches (sites 1,2 et 5). Ces résultats montrent une forte stabilité des positions et du nombre d'*IS6110* indépendamment de l'hôte chez lequel la souche a été isolée et du temps sur une période longue de 16 années, mais également du génotype (Figure 24). Ces trois positions semblent spécifiques de toutes les souches du Cluster A.

Les sites d'insertions récurrents retrouvés sont ceux qui avaient été décrits dans le panel 1. Cinq autres sites d'insertion sont retrouvés dans les souches de notre échantillon. Trois d'entre eux ne sont retrouvés qu'une seule fois dans le panel étudié et deux sites d'insertions sont retrouvés 2 et 3 fois (respectivement le site 3 et le site 47).



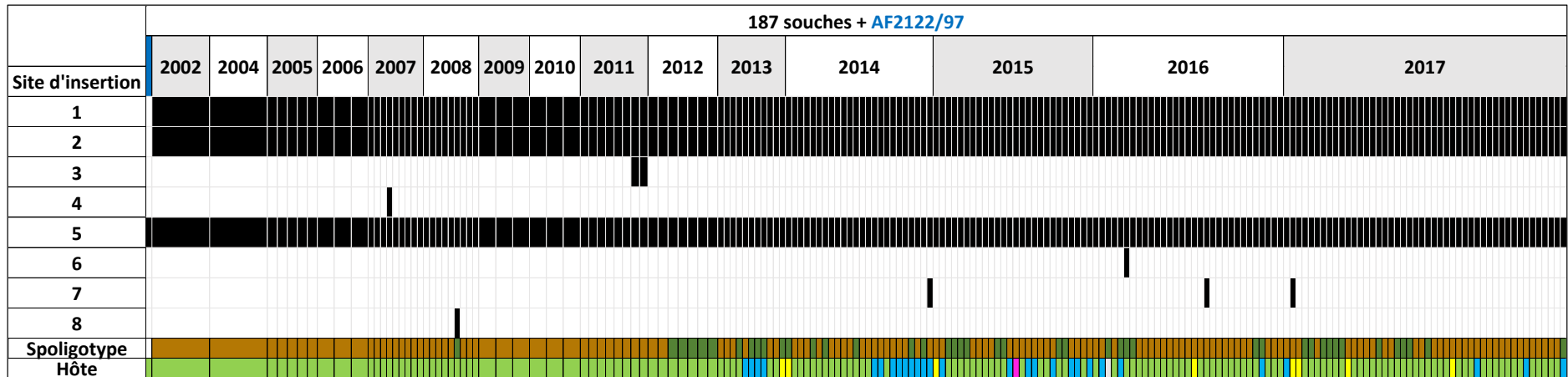


Figure 24 : Représentation des sites d'insertion d'IS6110 retrouvés dans 187 souches de spoligotype SB0821 (F007) et SB0832 (F015) (respectivement en marron et en vert) avec l'outil ISMapper et le génome de référence AF2122/97. Les sites d'insertion sont représentés par des carrés noirs et numérotés en fonction de la position sur le génome de référence (Annexe 4). Les 187 génomes sont présentés chronologiquement de 2002 à 2017 avec le génome de référence utilisé dans cette étude en première position. La dernière ligne permet de présenter l'hôte chez lequel a été isolé la souche : en vert le bovin (*Bos taurus*), en bleu le blaireau (*Meles meles*), en jaune le sanglier (*Sus scrofa*), en rose un porc et en gris un humain.

### **5.2.2. Génotype SB0120-DHV**

La recherche d'IS6110 a aussi été faite sur un panel de 227 souches SB0120-DHV (panel 4) isolées de plusieurs hôtes incluant des bovins, mais aussi des animaux de la faune sauvage sur une période de 17 ans (2000-2017).

Quarante-sept sites d'insertion différents ont été identifiés dans ce panel. Comme le suggéraient les résultats du panel 1, ce génotype a en moyenne 12 copies d'IS6110 avec 11 sites d'insertion présents dans presque toutes les souches du panel, qui semblent stable au cours du temps et quelle que soit l'espèce hôte chez laquelle elles ont été isolées (Figure 25).

Trois autres sites d'insertion sont récurrents : site 9 (41 souches, 18%), site 26 (23 souches, 10%) et site 46 (109 souches, 48%). Une analyse phylogénétique a permis d'observer des sous-clusters au sein du panel SB0120-DHV. En effet, les souches possédant l'insertion au site 9, 26 ou 46 sont localisées sur 3 branches bien distinctes permettant de définir des sous-clusters de ce génotype (Figure 26).

Ces groupes coïncident avec des clades définis lors d'une étude d'épidémiologie moléculaire réalisée sur le même panel (Modenesi, 2019). Les souches ayant le site 9 correspondent aux souches du clade 11 (Annexe 6). Les souches ayant le site 26 correspondent aux souches du clade 6, principalement isolées autour de la commune de Saint-Saud-Lacoussière. Le site d'insertion 26 est identifié pour la première fois dans une souche de 2004 puis en 2016, et est surtout retrouvé en 2017 où il représente 37% des souches isolées du panel pour cette année. Les souches ayant le site 46 correspondent aux souches appartenant aux clades 2, 5, 7, 8, 9 et 10.

La souche H2 du panel 1 fait partie du groupe avec le site d'insertion 9 tandis que la souche C10 du panel 1 et le génome complet Mb1855 font partie du sous-groupe avec le site d'insertion 46.

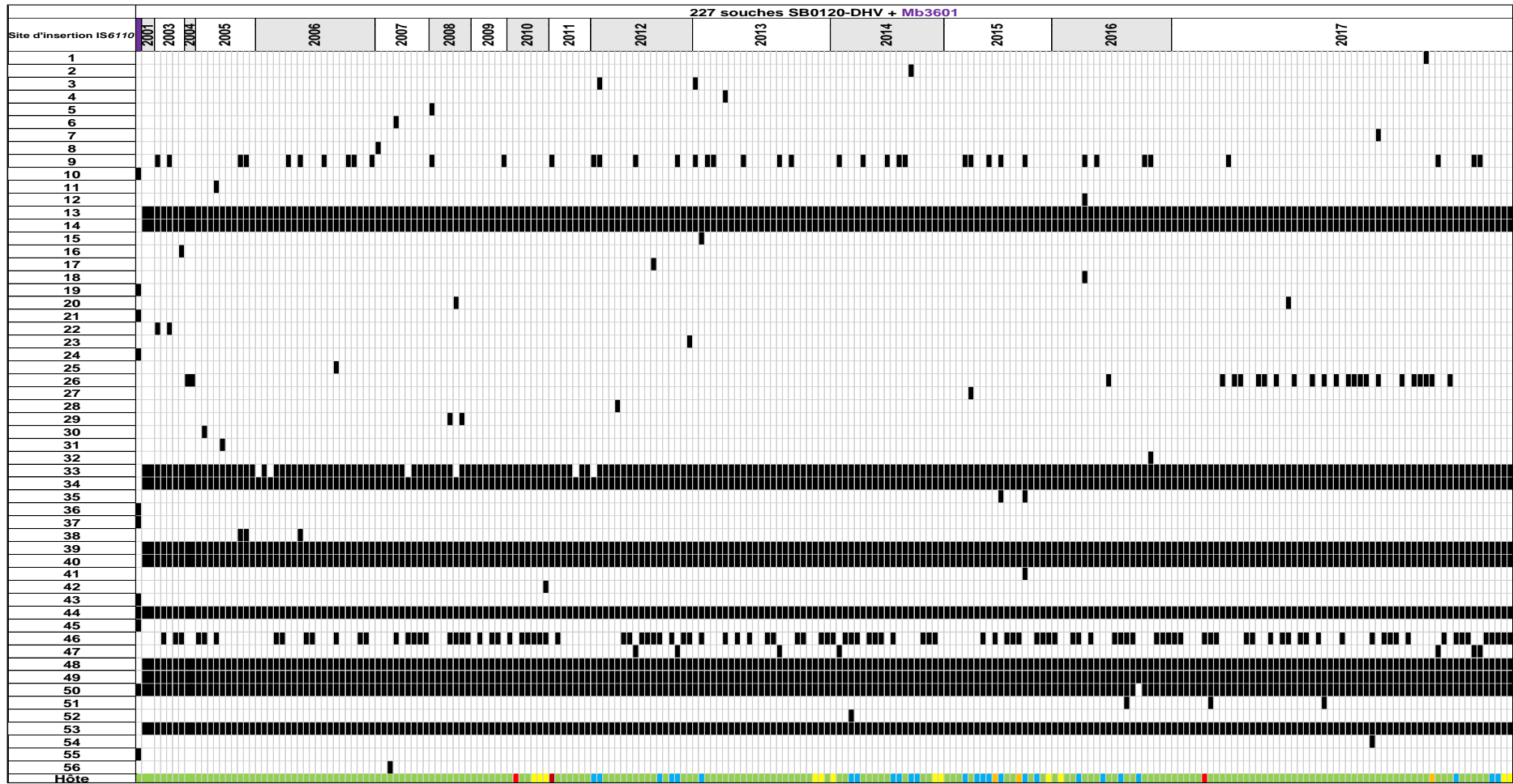


Figure 25 : Représentation des sites d'insertion d'IS6110 retrouvé dans 227 souches SB0120-DHV avec l'outil ISMapper et le génome de référence Mb3601. Les sites d'insertion sont représentés par des carrés noirs en fonction du site d'insertion où ils ont été retrouvés. Les positions exactes des sites sont disponibles en Annexe 5. Les 227 génomes sont présentés chronologiquement de 2001 à 2017 avec le génome de référence utilisé dans cette étude en première position. La dernière ligne permet de présenter l'hôte où a été isolé la souche avec en vert le bovin (*Bos taurus*), en bleu le blaireau (*Meles meles*), en jaune le sanglier (*Sus scrofa*), en orange le renard (*Vulpes vulpes*), en rouge le cerf (*Cervus elaphus*) et en rouge foncé le chevreuil (*Capreolus capreolus*).

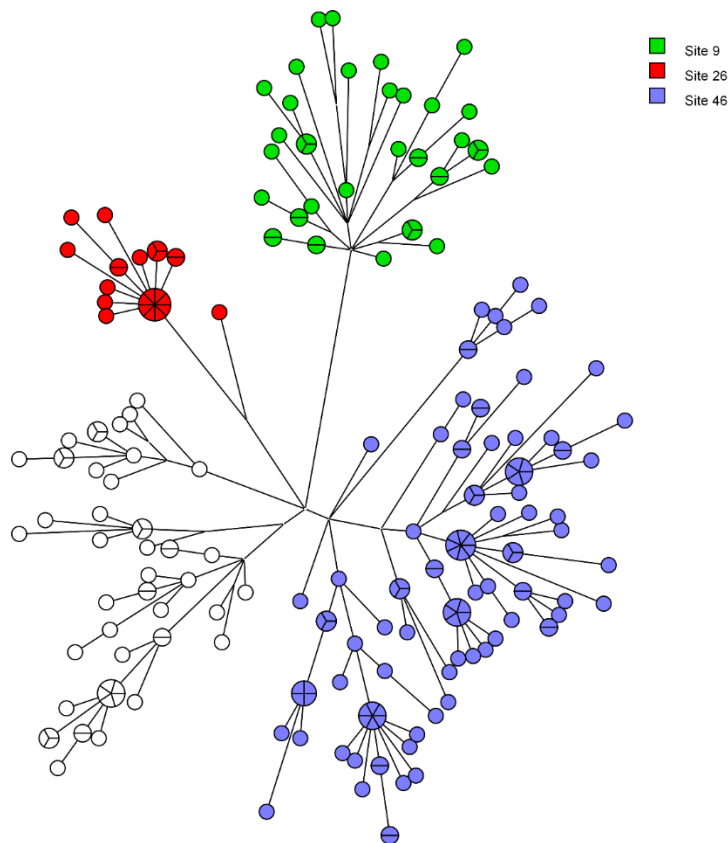


Figure 26 : Arbre du maximum de parcimonie de 227 génomes SB0120-DHV sur la base de 320 SNP déterminés en comparaison avec le génome de référence Mb3601. L'analyse a été réalisée sur le logiciel Bionumerics (version 7.6, AppliedMath, Belgique). Les souches portant les sites d'insertion 9, 26 et 46 sont colorées respectivement en vert, rouge et violet.

### **5.3. Variabilité de la séquence IS6110**

Les analyses bio-informatiques pour la recherche de l'IS6110 avec ISMapper ont mis en évidence plusieurs résultats inattendus : deux souches du cluster A qui ne possèdent pas la copie ancestrale localisée dans la région DR (D5 et D12), les souches du Cluster G qui ont nécessité une vérification manuelle et l'identification de plusieurs polymorphismes.

#### **5.3.1. IS6110 dans la région DR**

Afin de mieux comprendre l'absence de l'IS6110 dans la région DR pour les souches D5 et D12 du cluster A, une analyse bio-informatique de cette région a été réalisée. Celle de la souche D5 montre une délétion du 15<sup>ème</sup> au 25<sup>ème</sup> spacer (numéro utilisé en spoligotypage). Cette délétion a donc entraîné la perte de l'IS6110 qui est normalement toujours localisée entre le spacer 24 et 25 des membres de MTBC. Néanmoins, sur le profil spoligotype, le spacer 25 est toujours présent, car une duplication de cet spacer est localisée entre le 31<sup>ème</sup> et 32<sup>ème</sup> spacer. Cette région n'étant pas affectée, il est donc normal de retrouver ce spacer.

L'analyse de la région CRISPR-Cas de la souche D12 a mis en évidence une large délétion impliquant les 27 premiers spacer et 4 gènes *cas* (*cas1*, *cas2*, *cas6* et *cas5*). Une fois encore, le spacer 25 est retrouvé dans le spoligotype de D12 du fait de la duplication.

Dans le panel 1, il peut être observé que la délétion de *cas2* est associée à la délétion des 16 premiers spacer ou plus. Par ailleurs, d'autres sites d'insertion d'*IS6110* sont présents dans les gènes *cas* comme il avait été montré précédemment.

### **5.3.2. Particularité du cluster G**

Les résultats obtenus avec l'outil ISMapper ont nécessité une vérification pour les souches du Cluster G, car aucune *IS6110* n'était identifiée pour ce cluster. L'étude de la région CRISPR-Cas des souches du cluster G a montré qu'un événement de délétion a entraîné la perte de *cas1*, *cas2* et des 16 premiers spacers (Figure 27) ainsi que l'absence des spacers 23 et 24. Le séquençage de l'*IS6110* et de son site d'insertion par la technologie Sanger a mis en évidence une séquence tronquée de l'*IS6110* avec la perte de *orfA* et d'une partie de *orfB* (99 pb). La séquence *IS6110* du cluster G mesure 887 pb au lieu de 1355 pb ce qui explique le problème de détection par l'outil ISMapper qui recherche le début et la fin de la séquence *IS6110*.

### **5.3.3. Séquence d'*IS6110* mutée**

L'analyse des séquences d'*IS6110* dans les génomes monocopies a montré deux mutations dans l'*IS6110* ancestrale de souches du panel 1. Ces séquences mutées ont ensuite été confirmées par séquençage Sanger. La première est présente chez la souche F3 (SB0120) et correspond à un remplacement d'une guanine par une adénosine en position 377 de l'*orfB* ce qui induit un changement de peptide (une arginine en histidine) dans l'*orfB*. La deuxième est présente chez la souche E6 (SB0824) et correspond à un remplacement d'une cytosine par une adénosine en position 273 de l'*orfB*. Ce changement induit la production d'un codon stop dans *orfB* ce qui va interrompre le CDS et empêcher l'expression complète d'*orfB*.

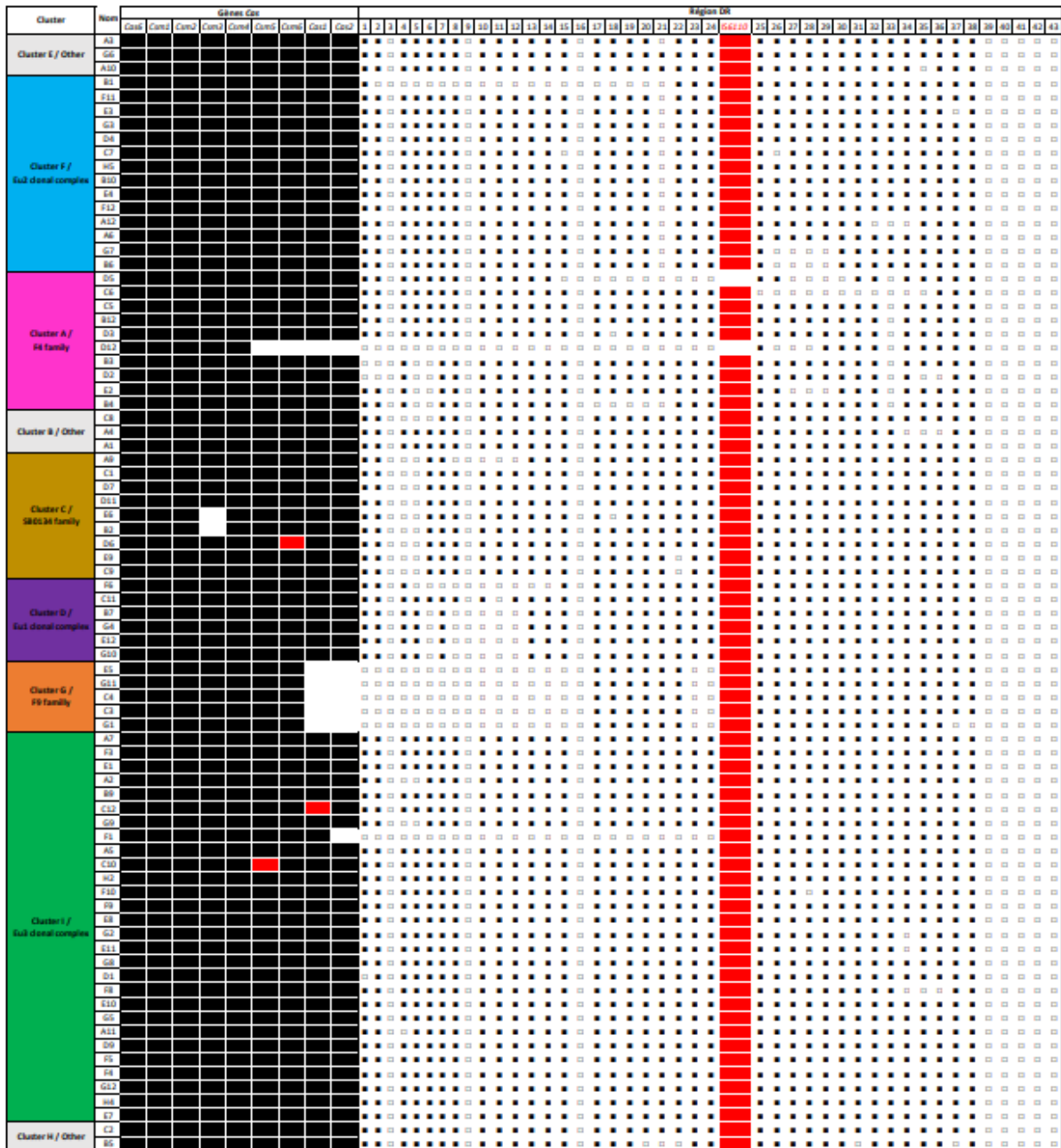


Figure 27 : Représentation du profil spoligotype et de la région CRISPR-Cas défini avec les outils bio-informatiques CRISPRbuilder-TB (<https://github.com/cguyeux/CRISPRbuilder-TB>) et TB-tools (<https://github.com/cguyeux/TB-tools>). L’analyse a été réalisée sur les génomes du panel 1. La présence d’un carré noir indique la présence d’un spacer. Les cases noires correspondent à la présence de gène cas et les cases rouges indiquent la présence d’IS6110, en accord avec les résultats du travail précédent sur leur recherche.

#### **5.4. Discussion**

Notre étude portant sur la diversité de *M. bovis* en France a montré que plus d'un tiers de souches représentatives de la diversité française sont multicopies, et en particulier les génotypes SB0120-CO et SB0120-DHV. Ces génotypes ainsi que les souches du Cluster A qui ont elles aussi plusieurs copies d'IS6110, sont celles qui circulent dans les régions avec les plus fortes prévalences de bTB au cours des 10 dernières années (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Hauer et al., 2015). Cette observation nous amène à nous demander si la transposition de l'IS6110 et les modifications génétiques qu'ils seraient en mesure de générer pourraient être en partie responsables de leur succès épidémiologique. Toute conséquence phénotypique des insertions IS6110 devrait être confirmée par des expériences *in vitro* ou *in vivo*. D'autres explications peuvent expliquer cette dominance génotypique, notamment la baisse de la diversité des souches qui conduit à un goulot d'étranglement associé suite à la mise en place de programmes de contrôle (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Hauer et al., 2015). Selon les résultats obtenus sur les 3 panels de souches sympatriques, le nombre de copies d'IS6110 et le site d'insertion semblent plutôt stable dans le temps et avoir une récurrence dans leurs positions génomiques. En outre, une adaptation spécifique à l'hôte par le biais de modifications liées à IS6110 ne semble pas avoir eu lieu comme cela avait été suggéré pour les souches de *M. tuberculosis* de la lignée de Beijing (Gonzalo-Asensio et al., 2018) tout au moins dans les périodes étudiées.

Néanmoins, l'étude du génotype SB0120-DHV a permis d'identifier 3 sites d'insertion récurrents, qui permettent de diviser le panel en sous-groupes ayant chacun un site d'insertion conservé. Cette plus grande diversité dans les sites d'insertion de ce génotype par rapport aux deux autres peut sûrement être expliquée par la période plus grande étudiée en comparaison avec le panel de souches SB0120-CO (6 années) et le nombre plus important de copies d'IS6110 en comparaison avec les souches du cluster A. En effet, une relation exponentielle a été montrée entre le nombre de copies et l'expression d'ARNm (Acide ribonucléique messenger) par copie d'IS6110, ce qui augmente les probabilités de traduction d'une transposase fonctionnelle et qui induit un événement de transposition (Gonzalo-Asensio et al., 2018) Les différences observées pourraient également être liées au taux d'évolution des souches qui sont différentes pour les trois panels. Le taux d'évolution des souches SB0120-DHV est de 0,56 SNP/génomomes/an alors que ceux des génotypes SB0120-CO et cluster A sont respectivement de 0,42 et 0,41 (Canini et al., 2022; Duault et al., 2022).

Les sites d'insertions sont néanmoins conservés dans le temps pour SB0120-DHV, puisque 11 copies sont retrouvées dans presque toutes les souches du panel étudié. De plus, il n'a pas été montré de changement de sites d'insertion lors de changement d'hôte pour ce groupe également.

Le fait que des sites d'insertion intragéniques soient conservés au cours du temps suggérerait que ces événements génétiques pourraient conférer un avantage sélectif aux souches par exemple en s'adaptant à leur nouvel environnement (Gonzalo-Asensio et al., 2018). Par exemple dans le groupe SB0120-DHV, le gène *glgC* est interrompu par le site d'insertion 9 (présent dans 18% des souches de notre panel) est connu pour être utile à la synthèse du glycogène (Carrieri et al., 2015; Cereijo et al., 2016). Le site d'insertion 46 des souches SB0120-DHV (présent dans 48% des souches de notre panel) interrompt le gène *csm5* qui fait partie du système CRISPR-Cas et qui aurait une importance sur la survie intracellulaire. De nombreux sites d'insertion ou délétion ont déjà été décrits dans cette région chez les membres du MTBC, en particulier sur les gènes *csm6*, *cas1* et *cas2* (Refrégier et al., 2019). Notamment, des délétions de *csm5* et *csm4* ont également été décrites chez *M. tuberculosis* Beijing (Refrégier et al., 2019; Singh et al., 2021). Néanmoins, l'impact des sites d'insertions mis en évidence dans cette étude sur le phénotype de *M. bovis*, est encore très hypothétique et nécessite d'autres études pour mieux comprendre leur rôle.

En dépit de la grande clonalité de *M. bovis*, la région CRISPR-Cas est une région polymorphique d'importance pour les études épidémiologiques avec l'utilisation du spoligotypage. L'évolution de cette région se fait par duplication du spacer ou de délétion (Freidlin et al., 2017; Refrégier et al., 2019). Cette région est particulièrement ciblée par les sites d'insertion d'IS6110 avec notamment la présence de l'IS6110 ancestrale, mais également d'autres sites d'insertion possibles dans les gènes *cas* comme celle présente dans les souches de SB0120-CO (Branger et al., 2020). Dans certains cas, cela peut amener à une recombinaison entre deux IS6110 et donner de large délétion des premiers spacer comme il est observé pour la souche F1 (SB0162) (Allix et al., 2006). Cet exemple montre encore une fois l'impact de l'IS6110 dans l'évolution de *M. bovis*.

L'IS6110 peut néanmoins être mutée, absente ou tronquée. L'absence de l'IS6110 ancestrale dans deux souches spécifiques du Cluster A montre que sa délétion est possible. Il pourrait être alors possible d'imaginer qu'une souche monocopie perde cette copie et devienne une souche sans IS6110 comme il a déjà été reporté pour *M. tuberculosis* (Howard et al., 1998; Huyen et al., 2013; Lok et al., 2002) et pour une souche de *M. bovis* de spoligotype SB2402 (Steensels et al., 2013).



La présence de séquence *IS6110* mutée a également pu être observée dans deux exemples précédemment reportés dans la littérature (Comín et al., 2022; Hirano et al., 2004). Concernant l'*IS6110* ancestrale tronquée dans les souches de la famille F9, deux *IS6110* sans *orfA* avaient déjà été trouvées au sein de la lignée L4 de *M. tuberculosis* (AP012340 et WBB1452\_10-01964-2) (Singh et al., 2021).

Ces derniers résultats montrent un certain polymorphisme de la séquence *IS6110*, voire l'absence partielle ou complète de la séquence. Ceci soulève l'importance d'inclure d'autres cibles génétiques telle que *IS1081* ou *mpb70* (Lorente-Leal et al., 2019; Michelet et al., 2018b) dans le diagnostic et la surveillance de la tuberculose bovine afin d'augmenter l'efficacité des programmes de surveillance.

## **6. Discussion générale**

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'obtenir de nouveaux génomes complets de différents clusters de *M. bovis* et d'améliorer nos connaissances sur les principaux génotypes circulant en France.

Dix génomes fermés et complets ont été obtenus qui, avec les génomes de référence déjà existants, permettent de bien représenter la diversité de *M. bovis* en France. En effet, notre étude permet de proposer, en plus d'AF2122/97 et Mb3601, un génome complet pour chaque principal cluster français décrit précédemment (Figure 28). Représentatifs également des principaux clusters présents dans d'autres pays, ils pourront ainsi être utilisés comme des références adaptées à ces groupes lors d'études d'épidémiologie génomique afin d'améliorer la compréhension de la transmission de *M. bovis* entre autres dans des systèmes multi-hôtes (Guimaraes and Zimpel, 2020).

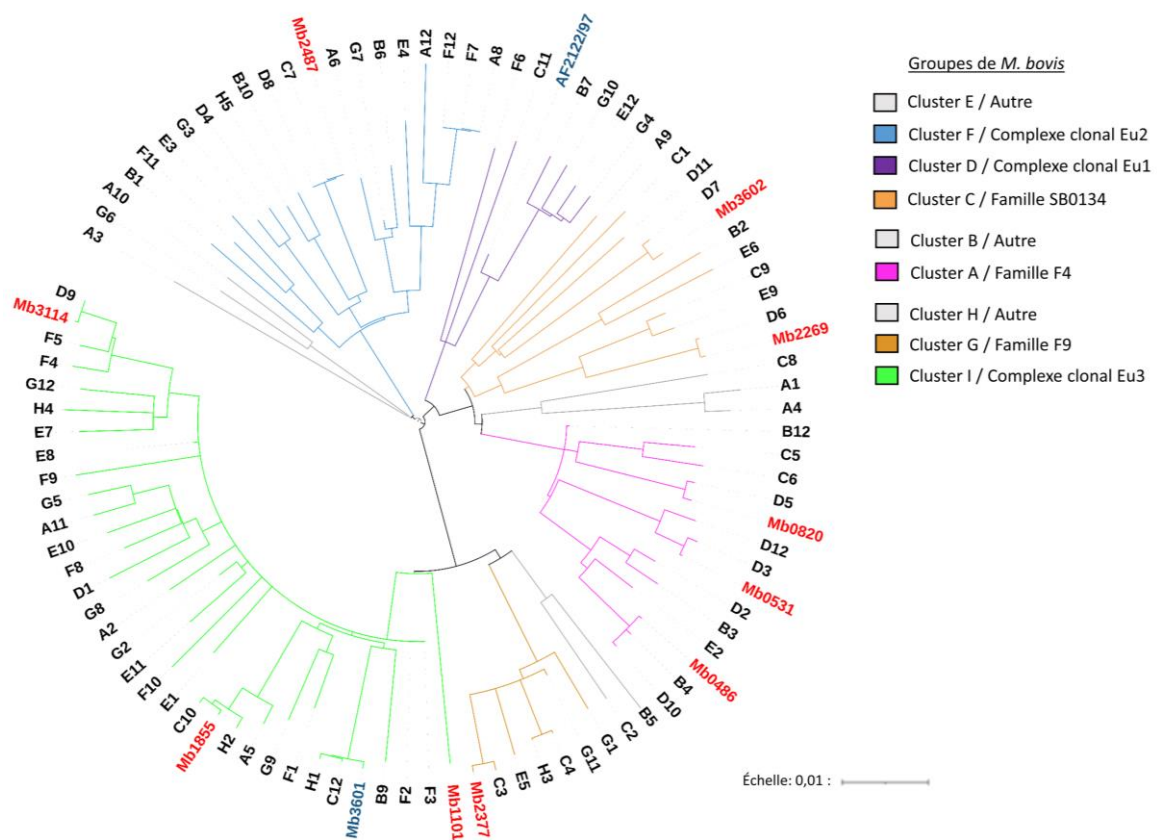


Figure 28 : Arbre phylogénétique circulaire de 98 génomes (Panel 1 et génomes complets) de *M. bovis*. Les deux génomes de référence, Mb3601 et AF2122/97 sont marqués en bleu. Les 10 nouveaux génomes complets sont indiqués en rouge. L'arbre phylogénétique est basé sur 7023 polymorphismes nucléotidiques simples du génome entier.

Ces nouvelles données permettent également une meilleure compréhension de la diversité génomique des souches de *M. bovis* en général. En effet, l'utilisation de génome complet lors d'étude pan-génomique permet une meilleure annotation de ceux-ci et une définition plus fine du génome accessoire qui peut être surestimé avec l'utilisation de génomes fragmentés et/ou d'outils qui ne sont pas adaptés.

Notre travail a mis en évidence un pan-génome fermé avec un faible nombre de gènes accessoires. En accord avec de récents travaux (Ceres et al., 2022), notre étude a également renforcé le fait que l'évolution de *M. bovis* se fait par perte de gènes ou pseudogénéisation plutôt que par acquisition de nouveaux gènes. Ceci montre la décomposition génomique de l'agent pathogène et l'importance des indels comme les principaux acteurs son évolution (Soler-Camargo et al., 2022). En effet ceux-ci peuvent amener une perte de fonction ou une variabilité de fonction permettant une plasticité phénotypique.

Malgré la forte similarité entre les différents génomes, un certain nombre de grands événements génomiques ont pu être mis en évidence, dont certains sont spécifiques de clusters et peuvent être utilisés comme leurs signatures. Ces données, en complément aux SNP déjà retrouvés et définis comme spécifiques de certaines lignées (Hauer et al., 2019; Zwyrer et al., 2021), permettent de mieux décrire les clusters de *M. bovis* présents en France, mais aussi dans le monde. Ce travail s'inscrit donc dans la continuité de récents travaux de classification de *M. bovis* qui ont pour but de proposer une nomenclature opérationnelle pour aider les études comparatives génomiques entre différents pays (Hauer et al., 2019; Zimpel et al., 2020; Zwyrer et al., 2021).

La différence de taille entre génomes s'explique en partie par le nombre variable de copies d'IS6110. Douze copies ont été trouvées dans Mb1855, une de plus que ce qui avait été trouvé dans Mb3601 (Branger et al., 2020). L'analyse des positions d'IS6110 dans les génomes complets n'a pas permis de montrer d'évènement de recombinaison (sauf peut être pour la copie tronquée de Mb2377) même si l'insertion de certaines copies dans des gènes présente une variabilité génétique.

La recherche de cette séquence sur un panel de souches plus large représentatif de la diversité française a permis de montrer que chez *M. bovis* l'IS6110 n'était pas présente seulement en monocopie ou avec un faible nombre de copies. En effet, plus d'un tiers des souches du panel sont multi-copies et 10% des souches étudiées avaient un nombre important de copies (>6) d'IS6110 (Fomukong et al., 1998). Celles-ci sont retrouvées dans un même groupe monophylétique. Néanmoins, le nombre de copies de cette séquence d'insertion et leur position dans le génome ne sont pas conservés chez tous les membres de ce nœud. En effet, seulement

un site d'insertion, autre que celui de la région DR qui est présent chez presque toutes les souches du MTBC, est commun entre les génomes de génotypes SB0120-CO et SB0120-DHV, qui ont évolué dans des zones géographiques différentes.

Dans ce travail, nous avons également montré une corrélation entre le nombre élevé de copies d'*IS6110* dans certaines souches et le fait qu'elles soient représentatives de certains génotypes qui représentent depuis les 15 dernières années 80% de foyers de tuberculose bovine en France (Cluster A, SB0120-CO et SB0120-DHV) (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Hauer et al., 2015). Cela nous a conduits à nous poser la question sur le rôle de l'*IS6110* dans le succès de ces génotypes persistant dans des régions très localisées où la bTB circule activement.

L'étude particulière des souches de trois génotypes des zones de forte prévalence en France a permis de voir une certaine stabilité du nombre et des sites d'insertion d'*IS6110* au cours du temps dans les périodes étudiées. L'étude du panel de souches de génotype SB0120-DHV a cependant mis en évidence des sous-populations qui peuvent être différenciées phylogénétiquement et par des sites d'insertion spécifiques d'*IS6110*. Bien que 11 sites semblent être très conservés dans ce génotype, les sous-groupes décrits dans cette étude ont chacun un site d'insertion spécifique qui semble lui aussi être retrouvé chez toutes les souches de ces sous-groupes. Les souches SB0120-DHV sont responsables d'un grand nombre de foyers ces dernières années dans une zone de plus en plus large qui s'étend maintenant à 4 départements. Le taux d'évolution plus élevé de ces souches ou l'apparition de nouveaux sites d'insertion d'*IS6110* soulèvent des questions sur le lien entre ces caractéristiques et le succès épidémiologique de ce génotype particulier qui doivent être explorées.

Le phénomène de transposition active décrite chez les souches Beijing *IS6110* multi-copies de *M. tuberculosis* qui conduirait à l'adaptation de la souche à un nouvel hôte ne semblerait pas se produire chez ces souches multi-copies de *M. bovis* (Gonzalo-Asensio et al., 2018). Nous ne pouvons néanmoins exclure que ce phénomène de transposition multiple, qui aurait pu conférer à ces génotypes de *M. bovis* la possibilité de circuler dans un réservoir multi-hôtes, ne soit pas survenu bien avant la période de collecte de nos souches. En effet, bien que le premier évènement de découverte d'infection *M. bovis* dans la faune sauvage ait été réalisé en 2000 en France (Zanella et al., 2008), l'absence de toute surveillance de la TB dans la faune a probablement empêché de mettre en évidence l'existence de l'infection chez des espèces sylvatiques. En effet, des récentes études de phylodynamie montrent que dans plusieurs régions où ces souches multi-copies circulent, les ancêtres communs des souches étudiées, y compris

issues d'animaux sauvages, remontent à plusieurs décennies, et ce depuis les années 80 (Canini et al., 2022; Duault et al., 2022). En tout état de cause, ce ne sont pas seulement ces transpositions multiples qui provoquent l'infection par *M. bovis* des espèces autres que les bovins. En effet, des souches de génotypes GB35-14 / SB0134 (Cluster C) de la forêt de Brotonne dont le génome complet Mb3602 est représentatif sont des souches monocopies pour l'IS6110 alors qu'il a été démontré depuis des longues années qu'elles circulent dans des systèmes multi-hôtes bovins-sangliers-blaireaux-cervidés (Delavenne et al., 2020). Ainsi, ces sites d'insertion multiples n'expliqueraient pas à eux seuls la persistance de génotypes spécifiques en France ou la possibilité d'une adaptation à différents hôtes animaux. D'autres événements génétiques en complément ou seuls pourraient également jouer un rôle dans la pérennisation de ces souches.

La baisse de la diversité des souches de *M. bovis*, décrite dans la littérature a réduit drastiquement le nombre de génotypes présent en France (Hauer et al., 2015). Des goulots d'étranglement ont certainement eu lieu dans le temps donnant lieu à la fixation de quelques génotypes de *M. bovis* circulant en France aujourd'hui (Boschioli et al., 2015; Delavenne et al., 2020; Hauer et al., 2015). Ces souches persistantes à l'heure actuelle, pourraient l'être à cause du programme de contrôle national qui ne serait pas assez efficace pour les éradiquer localement dans les régions où elles existaient déjà depuis longtemps (par exemple des mesures mal adaptées aux facteurs de risque épidémiologiques locaux). On pourrait également supposer qu'elles se sont pérennisées en raison d'une meilleure aptitude épidémiologique à un environnement et de leur capacité à échapper aux mesures de contrôle et/ou à infecter leurs hôtes grâce à des caractéristiques phénotypiques acquises après des modifications génétiques.

Nous avons observé que la distribution des indels (dont les IS6110) dans le génome ne semble pas être aléatoire. Les gènes impliqués dans ces événements génétiques sont principalement ceux impliqués dans des fonctions de réplication, recombinaison et réparation de l'ADN ainsi que dans la motilité cellulaire. Ces catégories de fonction ont des rôles importants dans la plasticité du génome mycobactérien (Fishbein et al., 2015; Vultos et al., 2008). Aucun gène reconnu comme essentiel dans la virulence n'est interrompu ou potentiellement régulé par le promoteur constitutif de l'IS6110 selon nos résultats (Forrellad et al., 2013).

## 7. Perspectives

Au vu des résultats présentés dans ce travail de thèse et des nouvelles avancées récentes dans les connaissances sur *M. bovis* et son génome, plusieurs axes de recherche semblent importants à développer. Il paraît important de confirmer la spécificité des événements génétiques trouvés pour des groupes de *M. bovis* dans cette étude. Les SNPs ou les indels pourront être recherchés *in vitro* (par PCR par exemple) ou *in silico* sur des panels de souches plus larges. En effet notre étude portant sur la diversité française de *M. bovis* a été réalisée sur un panel de 80 souches, mais il a été montré un nombre plus important de génotypes (498) circulant en France lors d'une étude se basant sur 4 654 souches (Hauer et al., 2015). Cela indique donc une plus grande diversité que celle sur laquelle nous sommes fondés qui pourrait amener des polymorphismes supplémentaires dans les régions génomiques que nous avons sélectionnées. Ce travail permettra également de décrire plus finement la classification de *M. bovis* en définissant des sous-groupes partageant des caractéristiques génétiques communes.

Les génomes complets vont permettre d'affiner les études d'épidémiologie moléculaire. En particulier, avec le déploiement progressif du WGS dans le cadre de la surveillance de la tuberculose bovine, les souches responsables des foyers actuels vont être étudiées afin de mieux comprendre la dynamique de transmission et le rôle de chaque espèce dans les systèmes multi-hôtes. Les études déjà en cours sur les génotypes SB0120-CO, SB0120-DHV, SB0821/F007 et SB0832/F015 vont se poursuivre sur les dernières années et s'étendre à l'ensemble de la zone infectée. Les autres génotypes (SB0134-GB35 de l'Ariège ou de la forêt de Brotonne, SB0999) vont également être étudiés et permettront une analyse de ces autres clusters. Le développement du WGS va permettre d'améliorer la surveillance en permettant ponctuellement de trouver des pistes pour comprendre l'origine de l'infection, établir un lien entre différents cheptels ou avec la faune sauvage.

La description des génomes complets a permis d'identifier de nombreux gènes mutés, partiellement tronqués ou absents. Certains de ces polymorphismes ont un rôle sur l'expression de gènes et pourraient avoir des conséquences sur le phénotype de la bactérie. Ces changements seraient susceptibles de moduler la virulence, la persistance ou la croissance de la mycobactérie. Afin de comprendre les différences phénotypiques engendrées par ces modifications génotypiques, des tests *in vitro* et/ou *in vivo* devront être réalisés. La surexpression ou l'inactivation d'un gène serait capable par exemple de montrer son impact sur la croissance bactérienne dans différentes conditions ou la réponse à un stress appliqué à la mycobactérie (stress acide) (García et al., 2021; Schwarz et al., 2021). Il serait par exemple intéressant d'étudier l'impact du gène *rpfD*, interrompu par une IS6110 dans les souches de SB0120-CO, dans l'initiation de la croissance dans différentes conditions et la résistance au stress.



En effet, la réactivation de la croissance métabolique de la mycobactérie (phénomène appelé ressuscitation) est favorisée par les facteurs *rpf* (*Resuscitation-promoting factors*) (Arroyo et al., 2016; Kana et al., 2008; Mir et al., 2011). Ces expériences pourraient être réalisées *in vitro* dans des milieux de culture classique pour les mycobactéries ou bien avec un pH de 5.6-5.7 pour mimer le pH intraphagosomal acide (García et al., 2021). Plusieurs modèles d'infection cellulaire pourraient être utilisés comme celui des cellules pulmonaires bovines mononucléées du sang périphérique (PBMC), le modèle de tranche de poumon découpé avec précision (PCLS) ou le modèle amibe (Butler et al., 2020; Remot et al., 2021; Waters et al., 2001). Une étude récente a analysé l'impact de l'inactivation de nombreuses séquences codantes sur le développement de l'infection de *M. bovis* en condition *in vivo* chez les bovins (Gibson et al., 2022). La comparaison de nos résultats (CDS muté ou tronqué) avec ceux de cette étude pourrait permettre de faire un premier tri dans le choix des cibles moléculaires d'intérêt.

A ce jour, nous ne savons pas si la transmissibilité, la virulence ou la persistance d'un génotype est réellement plus importante pour ceux qui sont prédominants que vis-à-vis des autres plus rares ou qui ne sont plus présents en France à l'heure actuelle. Pour cela, il serait intéressant d'avoir accès aux données cliniques des animaux afin d'avoir une idée de la pathogénicité des souches infectieuses isolées en France pour estimer si elles provoquent des cadres cliniques plus sévères. Une étude réalisée en Irlande du Nord dans ce but n'avait pas mis en évidence de différence systématique dans la taille et la répartition des lésions en lien avec les différents génotypes trouvés dans cette région (Wright et al., 2013). Au contraire, d'autres études ont montré la présence d'une virulence variable de différents génotypes de *M. bovis* chez les bovins et la faune sauvage (Abdelaal et al., 2019; Garbaccio et al., 2014; Gormley and Corner, 2018; Vargas-Romero et al., 2016). Dans une récente étude, il avait été montré que la souche Mb3601 (génotype SB0120-CO), avait induit une signature inflammatoire plus forte dans le poumon que la souche AF2122/97 (Remot et al., 2021). Ces informations sur les génotypes français pourraient donc peut-être permettre d'émettre des hypothèses sur le succès épidémiologique de certains parmi elles. Il a également été suggéré une différence de sensibilité des races bovines lors de l'infection d'une souche particulière de *M. bovis* (Ameni et al., 2007; Remot et al., 2021, McHenry et al., 2020). Néanmoins, des corrélations entre marqueur de sensibilité et de résistance entre les bovins individuellement indépendamment de la race, sont désormais identifiées (Driscoll et al., 2011). Il serait alors également intéressant d'étudier la sensibilité des races/génétique de bovins aux différents génotypes de *M. bovis* circulant en France afin d'évaluer s'il existe une corrélation entre les deux pouvant ouvrir des perspectives d'association de contrôle de bTB et de sélection génétique bovine.

## 8. Références

- Abdallah, A.M., Hill-Cawthorne, G.A., Otto, T.D., Coll, F., Guerra-Assunção, J.A., Gao, G., Naeem, R., Ansari, H., Malas, T.B., Adroub, S.A., Verboom, T., Ummels, R., Zhang, H., Panigrahi, A.K., McNerney, R., Brosch, R., Clark, T.G., Behr, M.A., Bitter, W., Pain, A., 2015. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep15443>
- Abdelaal, H.F., Spalink, D., Amer, A., Steinberg, H., Hashish, E.A., Nasr, E.A., Talaat, A.M., 2019. Genomic polymorphism associated with the emergence of virulent isolates of *Mycobacterium bovis* in the Nile Delta. *Scientific reports* 9, 1–15.
- Aitken, M.L., Limaye, A., Pottinger, P., Whimbey, E., Goss, C.H., Tonelli, M.R., Cangelosi, G.A., Dirac, M.A., Olivier, K.N., Brown-Elliott, B.A., 2012. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies massiliense in a lung transplant and cystic fibrosis center. *American journal of respiratory and critical care medicine* 185, 231–232.
- Akhmetova, A., Guerrero, J., McAdam, P., Salvador, L.C.M., Crispell, J., Lavery, J., Presho, E., Kao, R.R., Biek, R., Menzies, F., Trimble, N., Harwood, R., Pepler, P.T., Oravcova, K., Graham, J., Skuce, R., Plessis, L. du, Thompson, S., Wright, L., Byrne, A., Allen, A.R., 2021. Genomic epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in sympatric badger and cattle populations in Northern Ireland. *bioRxiv* 2021.03.12.435101. <https://doi.org/10.1101/2021.03.12.435101>
- Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16, 1296–1299. <https://doi.org/10.3201/eid1608.100314>
- Alexander, K.A., Pleydell, E., Williams, M.C., Lane, E.P., Nyange, J.F.C., Michel, A.L., 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: An Emerging Disease of Free-Ranging Wildlife. *Emerg Infect Dis* 8, 598–601. <https://doi.org/10.3201/eid0806.010358>
- Algammal, A.M., Hashem, H.R., Al-Otaibi, A.S., Alfifi, K.J., El-Dawody, E.M., Mahrous, E., Hetta, H.F., El-Kholy, A.W., Ramadan, H., El-Tarabili, R.M., 2021. Emerging MDR-*Mycobacterium avium* subsp. *avium* in house-reared domestic birds as the first report in Egypt. *BMC Microbiol* 21, 237. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02287-y>
- Alkan, C., Sajjadian, S., Eichler, E.E., 2011. Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nature methods* 8, 61–65.
- Allen, A., McAdam, P., Presho, E., Hughes, C., Rutherford, D., Bell, C., Watson, L., Mullan, G., Kao, R., Crispell, J., Akhmetova, A., Menzies, F., McCormick, C., McGuckian, P., Kirke, R., Skuce, R., 2019. Genome epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in contemporaneous, sympatric badger and cattle populations in Northern Ireland. *Access Microbiology* 1. <https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0218>
- Allen, A., Skuce, R.A., Byrne, A., 2018. Bovine tuberculosis in Britain and Ireland—A perfect storm? the confluence of potential ecological and epidemiological impediments to controlling a chronic infectious disease. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 109.
- Allen, A.R., Ford, T., Skuce, R.A., 2021. Does *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* Survival in the Environment Confound Bovine Tuberculosis Control and Eradication? A Literature Review. *Vet Med Int* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8812898>
- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006. Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 1951–1962. <https://doi.org/10.1128/JCM.01775-05>
- Almaw, G., Mekonnen, G.A., Mihret, A., Aseffa, A., Taye, H., Conlan, A.J.K., Gumi, B., Zewude, A., Aliy, A., Tamiru, M., Olani, A., Lakew, M., Sombo, M., Gebre, S., Diguimbaye, C., Hilty, M., Fané, A., Müller, B., Hewinson, R.G., Ellis, R.J., Nunez-Garcia, J., Palkopoulou, E., Abebe, T., Ameni, G., Parkhill, J., Wood, J.L.N., Berg, S., van Tonder, A.J., 2021. Population structure and transmission of *Mycobacterium bovis* in Ethiopia. *Microb Genom* 7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000539>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Amarasinghe, S.L., Su, S., Dong, X., Zappia, L., Ritchie, M.E., Gouil, Q., 2020. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biol* 21, 30. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1935-5>
- Ambrosio, S.R., de Deus Oliveira, E.M., Rodriguez, C.A.R., Ferreira Neto, J.S., Amaku, M., 2008. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Braz J Microbiol* 39, 241–244. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200008>
- Ameni, G., Aseffa, A., Engers, H., Young, D., Gordon, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., 2007. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1356–1361.

- Ameni, G., Erkihun, A., 2007. Bovine tuberculosis on small-scale dairy farms in Adama town, central Ethiopia, and farmer awareness of the disease, in: Scientific and Technical Review of the Office International Des Epizooties. pp. 711–719.
- Ameni, G., Tadesse, K., Hailu, E., Deresse, Y., Medhin, G., Aseffa, A., Hewinson, G., Vordermeier, M., Berg, S., 2013. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* between Farmers and Cattle in Central Ethiopia. PLOS ONE 8, e76891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076891>
- Amoroso, M., Böttcher, A., Lowry, C.A., Langgartner, D., Reber, S.O., 2020. Subcutaneous *Mycobacterium vaccae* promotes resilience in a mouse model of chronic psychosocial stress when administered prior to or during psychosocial stress. Brain, Behavior, and Immunity 87, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.12.018>
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez Rodríguez, L., 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 53, 1785–9. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02532-0>
- Aranaz, A., Liebana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez Rodríguez, L., 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: A taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. International journal of systematic bacteriology 49 Pt 3, 1263–73. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1263>
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Dominguez, L., Vidal, D., Domingo, M., Gonzolez, O., Rodriguez-Ferri, E.F., Bunschoten, A.E., Embden, J.D.V., Cousins, D., 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology 34, 2734–2740.
- Arega, S.M., Conraths, F.J., Ameni, G., 2013. Prevalence of tuberculosis in pigs slaughtered at two abattoirs in Ethiopia and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from tuberculous-like lesions in pigs. BMC Vet Res 9, 97. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-97>
- Arroyo, L., Rojas, M., Ortíz, B.L., Franken, K.L.M.C., García, L.F., Ottenhoff, T.H.M., Barrera, L.F., 2016. Dynamics of the T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* *DosR* and *Rpf* antigens in a Colombian population of household contacts of recently diagnosed pulmonary tuberculosis patients. Tuberculosis 97, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.12.008>
- Asare, P., Asante-Poku, A., Prah, D.A., Borrell, S., Osei-Wusu, S., Otchere, I.D., Forson, A., Adjapong, G., Koram, K.A., Gagneux, S., Yeboah-Manu, D., 2018. Reduced transmission of *Mycobacterium africanum* compared to *Mycobacterium tuberculosis* in urban West Africa. Int J Infect Dis 73, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.05.014>
- Ashton, P.M., Nair, S., Dallman, T., Rubino, S., Rabsch, W., Mwaigwisya, S., Wain, J., O’grady, J., 2015. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. Nature biotechnology 33, 296–300.
- Avila, L.N., Gonçalves, V.S.P., Perez, A.M., 2018. Risk of Introduction of Bovine Tuberculosis (TB) Into TB-Free Herds in Southern Bahia, Brazil, Associated With Movement of Live Cattle. Front Vet Sci 5, 230. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00230>
- Azé, J., Sola, C., Zhang, J., Lafosse-Marin, F., Yasmin, M., Siddiqui, R., Kremer, K., van Soolingen, D., Refrégier, G., 2015. Genomics and Machine Learning for Taxonomy Consensus: The *Mycobacterium tuberculosis* Complex Paradigm. PLoS One 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130912>
- Ballesteros, C., Garrido, J., Vicente, J., Romero, B., Scimeca, R., Minguijon, E., Villar, M., Martín-Hernando, M.P., Sevilla, I., Juste, R., Aranaz, A., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2009. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. Vaccine 27, 6662–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.095>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J Comput Biol 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Banos, G., Winters, M., Mrode, R., Mitchell, A.P., Bishop, S.C., Woolliams, J.A., Coffey, M.P., 2017. Genetic evaluation for bovine tuberculosis resistance in dairy cattle. Journal of Dairy Science 100, 1272–1281. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11897>
- Barbier, E., Boschirolì, M.-L., Gueneau, E., Dequaire-Rochelet, M., Payne, A., Cruz, K., Bliex, A.L., Fossot, C., Hartmann, A., 2016. First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis. Journal of applied microbiology 120. <https://doi.org/10.1111/jam.13090>

- Barbier, E., Rochelet, M., Gal, L., Boschiroli, M.L., Hartmann, A., 2017. Impact of temperature and soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment. PLoS ONE 12, e0176315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176315>
- Barlow, A.M., Mitchell, K.A., Visram, K.H., 1999. Bovine tuberculosis in llama (*Lama glama*) in the UK. Vet Rec 145, 639–640. <https://doi.org/10.1136/vr.145.22.639>
- Barlow, N.D., Kean, J.M., Hickling, G., Livingstone, P.G., Robson, A.B., 1997. A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. Preventive Veterinary Medicine 32, 57–75. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(97\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00002-0)
- Baunin, C., Beigelman, C., Brauner, M., Carette, M.-F., Debray, M.-P., le Pointe, H.D., Durand, C., Durand, G., El Hajjam, M., Fajadet, P., Ferretti, G., Gevenois, P.-A., Ghaye, B., Giron, J., Hackx, M., Jeanbourquin, D., Khalil, A., Lacombe, P., Lacout, A., Madani, A., Maître, S., Meunier, C., Metge, L., Padovani, B., Resten, A., Scillia, P., Tack, D. (Eds.), 2013. CHAPITRE 8 - PATHOLOGIE INFECTIEUSE, in: Imagerie Thoracique (Deuxième Édition). Elsevier Masson, Paris, pp. 513–583. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71321-7.50016-1>
- Beggs, M.L., Eisenach, K.D., Cave, M.D., 2000. Mapping of IS6110 Insertion Sites in Two Epidemic Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J. CLIN. MICROBIOL. 38, 6.
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., Small, P.M., 1999. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. Science.
- Benet, J.-J., Boschiroli, M.-L., Dufour, B., Garin-Bastuji, B., 2006. Lutte contre la tuberculose bovine en France de 1954 à 2004 : Analyse de la pertinence épidémiologique de l'évolution de la réglementation. Epidémiol. et santé anim. 50, 127–143.
- Benton, C.H., Phoenix, J., Smith, F.A.P., Robertson, A., McDonald, R.A., Wilson, G., Delahay, R.J., 2020. Badger vaccination in England: Progress, operational effectiveness and participant motivations. People and Nature 2, 761–775. <https://doi.org/10.1002/pan3.10095>
- Berg, S., Garcia-Pelayo, M.C., Müller, B., Hailu, E., Asimwe, B., Kremer, K., Dale, J., Boniotti, M.B., Rodriguez, S., Hilty, M., Rigouts, L., Firdessa, R., Machado, A., Mucavele, C., Ngandolo, B.N.R., Bruchfeld, J., Boschiroli, L., Müller, A., Sahraoui, N., Pacciarini, M., Cadmus, S., Joloba, M., van Soolingen, D., Michel, A.L., Djonne, B., Aranaz, A., Zinsstag, J., van Helden, P., Portaels, F., Kazwala, R., Källenius, G., Hewinson, R.G., Aseffa, A., Gordon, S.V., Smith, N.H., 2011. African 2, a Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Epidemiologically Important in East Africa. J Bacteriol 193, 670–678. <https://doi.org/10.1128/JB.00750-10>
- Bermingham, M.L., Bishop, S.C., Woolliams, J.A., Pong-Wong, R., Allen, A.R., McBride, S.H., Ryder, J.J., Wright, D.M., Skuce, R.A., McDowell, S.W., Glass, E.J., 2014. Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. Heredity (Edinb) 112, 543–551. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.137>
- Bespiatykh, D., Bespyatykh, J., Mokrousov, I., Shitikov, E., 2021. A Comprehensive Map of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Regions of Difference. mSphere 6, e00535-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00535-21>
- Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Aranaz, A., Juan, L. de, 2012. Tuberculosis in goats: Assessment of current *in vivo* cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. The Veterinary Journal 191, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.02.010>
- Biek, R., O'Hare, A., Wright, D., Mallon, T., McCormick, C., Orton, R.J., McDowell, S., Trewby, H., Skuce, R.A., Kao, R.R., 2012. Whole Genome Sequencing Reveals Local Transmission Patterns of *Mycobacterium bovis* in Sympatric Cattle and Badger Populations. PLOS Pathogens 8, e1003008. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003008>
- Biet, F., Boschiroli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A., 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 36, 411–436. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005001>
- Bigi, F., Garcia-Pelayo, M.C., Nuñez-García, J., Peralta, A., Caimi, K.C., Golby, P., Hinds, J., Cataldi, A., Gordon, S.V., Romano, M.I., 2005. Identification of genetic markers for *Mycobacterium pinnipedii* through genome analysis. FEMS Microbiology Letters 248, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.034>
- Blouin, Y., Cazajous, G., Dehan, C., Soler, C., Vong, R., Hassan, M.O., Hauck, Y., Boulais, C., Andriamanantena, D., Martinaud, C., Martin, É., Pourcel, C., Vergnaud, G., 2014. Progenitor “*Mycobacterium canettii*” Clone Responsible for Lymph Node Tuberculosis Epidemic, Djibouti. Emerg Infect Dis 20, 21–28. <https://doi.org/10.3201/eid2001.130652>
- Boniotti, M.B., Gorla, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zanoni, M., Zoppi, S., Dondo, A., Tagliabue, S., Bonora, S., Zanardi, G., Pacciarini, M.L., 2009. Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in Italy from 2000 to 2006 and Evaluation of Variable-Number

- Tandem Repeats for Geographically Optimized Genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 636–644. <https://doi.org/10.1128/JCM.01192-08>
- Bonsu, O.A., Laing, E., Akanmori, B.D., 2000. Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. *Acta Tropica* 76, 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00082-6)
- Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H.O., Al-Gaabary, M., Matsumoto, T., 2022. Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant *Mycobacterium* Species. *Pathogens* 11, 715.
- Boschioli, M.L., Bénet, J., 2014. Bovine tuberculosis eradication in France. *Zoonotic tuberculosis: mycobacterium bovis and other pathogenic mycobacteria* 341–347.
- Boschioli, M.-L., Benet, J.-J., 2014. *Zoonotic Tuberculosis: Mycobacterium bovis and Other Pathogenic Mycobacteria*, Third Edition. pp. 341–347. <https://doi.org/10.1002/9781118474310.ch29>
- Boschioli, M.-L., Michelet, L., Hauer, A., Cruz, K., Courcoul, A., Hénault, S., Karoui, C., Palisson, A., Biet, F., Zanella, G., 2015. Tuberculose bovine en France : cartographie des souches de *Mycobacterium bovis* entre 2000-2013. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 70, 2–8.
- Bourgoin, A., Agius, G., 1995. Le point sur les méthodes classiques d'identification des mycobactéries. *Revue Française des Laboratoires* 1995, 21–26. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(95\)80194-4](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(95)80194-4)
- Bouزيد, F., Astier, H., Osman, D.A., Javelle, E., Hassan, M.O., Simon, F., Garnotel, E., Drancourt, M., 2018. Extended spectrum of antibiotic susceptibility for tuberculosis, Djibouti. *International Journal of Antimicrobial Agents* 51, 235–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.07.007>
- Branger, M., Loux, V., Cochard, T., Boschioli, M.L., Biet, F., Michelet, L., 2020. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* Mb3601, a SB0120 spoligotype strain representative of a new clonal group. *Infection, Genetics and Evolution* 82, 104309. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104309>
- Brites, D., Loiseau, C., Menardo, F., Borrell, S., Boniotti, M.B., Warren, R., Dippenaar, A., Parsons, S.D.C., Beisel, C., Behr, M.A., Fyfe, J.A., Coscolla, M., Gagneux, S., 2018. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02820>
- Brooks-Pollock, E., Conlan, A.J., Mitchell, A.P., Blackwell, R., McKinley, T.J., Wood, J.L., 2013. Age-dependent patterns of bovine tuberculosis in cattle. *Veterinary Research* 44, 97. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-97>
- Brooks-Pollock, E., Roberts, G.O., Keeling, M.J., 2014. A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. *Nature* 511, 228–231.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Buchrieser, C., Pym, A.S., Garnier, T., Cole, S.T., 2000. Comparative Genomics Uncovers Large Tandem Chromosomal Duplications in *Mycobacterium Bovis* BCG Pasteur. *Yeast* 17, 111–123. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000630\)17:2<111::AID-YEA17>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000630)17:2<111::AID-YEA17>3.0.CO;2-G)
- Brosch, R., Gordon, S.V., Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos Santos, S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J.K., Golby, P., Garcia, J.N., Hewinson, R.G., Behr, M.A., Quail, M.A., Churcher, C., Barrell, B.G., Parkhill, J., Cole, S.T., 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5596–5601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700869104>
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>
- Brosch, R., Philipp, W.J., Stavropoulos, E., Colston, M.J., Cole, S.T., Gordon, S.V., 1999. Genomic Analysis Reveals Variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the Attenuated M. tuberculosis H37Ra Strain. *Infect Immun* 67, 5768–5774.
- Brotherstone, S., White, I.M.S., Coffey, M., Downs, S.H., Mitchell, A.P., Clifton-Hadley, R.S., More, S.J., Good, M., Woolliams, J.A., 2010. Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Dairy Science* 93, 1234–1242. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2609>
- Broughan, J.M., Judge, J., Ely, E., Delahay, R.J., Wilson, G., Clifton-Hadley, R.S., Goodchild, A.V., Bishop, H., Parry, J.E., Downs, S.H., 2016. A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. *Epidemiology & Infection* 144, 2899–2926. <https://doi.org/10.1017/S095026881600131X>
- Bryant, J.M., Grogono, D.M., Greaves, D., Foweraker, J., Roddick, I., Inns, T., Reacher, M., Haworth, C.S., Curran, M.D., Harris, S.R., 2013. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *The Lancet* 381, 1551–1560.
- Bryant, J.M., Grogono, D.M., Rodriguez-Rincon, D., Everall, I., Brown, K.P., Moreno, P., Verma, D., Hill, E., Drijckoning, J., Gilligan, P., 2016. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* 354, 751–757.

- Buddle, B., de Lisle, G., Pfeffer, A., Aldwell, F., 1995. Immunological responses and protection against *Mycobacterium Bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 13, 1123–30. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)00055-R](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)00055-R)
- Buddle, B.M., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Andersen, P., de Lisle, G.W., 2001. Use of ESAT-6 in the interferon- $\gamma$  test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary Microbiology* 80, 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00375-8)
- Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., de Klerk-Lorist, L.-M., 2018. Efficacy and Safety of BCG Vaccine for Control of Tuberculosis in Domestic Livestock and Wildlife. *Front. Vet. Sci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00259>
- Butler, R.E., Smith, A.A., Mendum, T.A., Chandran, A., Wu, H., Lefrançois, L., Chambers, M., Soldati, T., Stewart, G.R., 2020. *Mycobacterium bovis* uses the ESX-1 Type VII secretion system to escape predation by the soil-dwelling amoeba *Dictyostelium discoideum*. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0572-z>
- Buzic, I., Giuffra, V., 2020. The paleopathological evidence on the origins of human tuberculosis: a review. *J Prev Med Hyg* 61, E3–E8. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1s1.1379>
- Cadmus, S.I., Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., van Soolingen, D., 2009. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in Goats, Nigeria. *Emerg Infect Dis* 15, 2066–2067. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090319>
- Canini, L., Durand, B., Duault, H., Boschirolì, M.L., Michelet, L., 2022. Modélisation de la transmission de *Mycobacterium bovis* entre animaux domestiques et sauvages : comparaison de trois zones d'endémie.
- Cardona, P.-J., Català, M., Prats, C., 2020. Origin of tuberculosis in the Paleolithic predicts unprecedented population growth and female resistance. *Scientific Reports* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56769-1>
- Carmichael, J., 1941. Bovine Tuberculosis in the Tropics with Special Reference to Uganda: Part II. *The Veterinary Journal* (1900) 97, 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0372-5545\(17\)34205-0](https://doi.org/10.1016/S0372-5545(17)34205-0)
- Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G.S., de Garine-Wichatitsky, M., Gaidet, N., 2015. Bridge hosts, a missing link for disease ecology in multi-host systems. *Veterinary Research* 46, 1–11.
- Carrieri, D., Broadbent, C., Carruth, D., Paddock, T., Ungerer, J., Maness, P.-C., Ghirardi, M., Yu, J., 2015. Enhancing photo-catalytic production of organic acids in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803  $\Delta$ glgC, a strain incapable of glycogen storage. *Microb Biotechnol* 8, 275–280. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12243>
- Castets, M., Boisvert, H., Grumbach, F., Brunel, M., Rist, N., 1968. Les bacilles tuberculeux de type Africain: note préliminaire. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 32, 179–84.
- Cavalerie, L., Courcoul, A., Boschirolì, M.L., Réveillaud, E., Gay, P., 2014. Tuberculose bovine. *Santé animale-alimentation* 4.
- Cavirani, S., Fanti, F., Conti, S., Calderaro, A., Foni, E., Dettori, G., Chezzi, C., Scatozza, F., 1999. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine tissue samples by the abbot LCX *Mycobacterium tuberculosis* assay and comparison with culture methods. *The new microbiologica* 22, 343–9.
- Cereijo, A.E., Asencion Diez, M.D., Dávila Costa, J.S., Alvarez, H.M., Iglesias, A.A., 2016. On the Kinetic and Allosteric Regulatory Properties of the ADP-Glucose Pyrophosphorylase from *Rhodococcus jostii*: An Approach to Evaluate Glycogen Metabolism in Oleaginous Bacteria. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00830>
- Ceres, K.M., Stanhope, M.J., Gröhn, Y.T., 2022. A critical evaluation of *Mycobacterium bovis* pangenomics, with reference to its utility in outbreak investigation. *Microbial Genomics* 8, 000839.
- Chambers, M.A., Rogers, F., Delahay, R.J., Lesellier, S., Ashford, R., Dalley, D., Gowtage, S., Davé, D., Palmer, S., Brewer, J., Crawshaw, T., Clifton-Hadley, R., Carter, S., Cheeseman, C., Hanks, C., Murray, A., Palphramand, K., Pietravalle, S., Smith, G.C., Tomlinson, A., Walker, N.J., Wilson, G.J., Corner, L.A.L., Rushton, S.P., Shirley, M.D.F., Gettinby, G., McDonald, R.A., Hewinson, R.G., 2011. *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination reduces the severity and progression of tuberculosis in badgers. *Proc Biol Sci* 278, 1913–1920. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1953>
- Chandran, A., Williams, K., Mendum, T., Stewart, G., Clark, S., Zadi, S., Lanni, F., McLeod, N., Williams, A., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, M., Maroudam, V., Prasad, A., Bharti, N., Banerjee, R., Manjari Kasibhatla, S., McFadden, J., 2019. Development of a diagnostic compatible BCG vaccine against Bovine tuberculosis. *Sci Rep* 9, 17791. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54108-y>
- Charles, C., Conde, C., Biet, F., Boschirolì, M.L., Michelet, L., 2022. IS6110 Copy Number in Multi-Host *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in Bovine Tuberculosis Endemic French Regions. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Chen, Y.-C., Liu, T., Yu, C.-H., Chiang, T.-Y., Hwang, C.-C., 2013. Effects of GC Bias in Next-Generation-Sequencing Data on De Novo Genome Assembly. *PLOS ONE* 8, e62856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062856>

- Cheng, G., Hussain, T., Sabir, N., Ni, J., Li, M., Zhao, D., Zhou, X., 2018. Comparative study of the molecular basis of pathogenicity of *M. bovis* strains in a mouse model. *International journal of molecular sciences* 20, 5.
- Chiari, M., Ferrari, N., Giardiello, D., Avisani, D., Pacciarini, M., Loris, A., Zanoni, M., Boniotti, M., 2015. Spatiotemporal and Ecological Patterns of *Mycobacterium microti* Infection in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.12313>
- Chiari, M., Zanoni, M., Alborali, L.G., Zanardi, G., Avisani, D., Tagliabue, S., Gaffuri, A., Pacciarini, M.L., Boniotti, M.B., 2014. Isolation of *Mycobacterium caprae* (Lechtal Genotype) from Red Deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 50, 330–333. <https://doi.org/10.7589/2013-06-135>
- Chitsaz, H., Yee-Greenbaum, J.L., Tesler, G., Lombardo, M.-J., Dupont, C.L., Badger, J.H., Novotny, M., Rusch, D.B., Fraser, L.J., Gormley, N.A., Schulz-Trieglaff, O., Smith, G.P., Evers, D.J., Pevzner, P.A., Lasken, R.S., 2011. Efficient *de novo* assembly of single-cell bacterial genomes from short-read data sets. *Nature Biotechnology* 29, 915–921. <https://doi.org/10.1038/nbt.1966>
- Cleaveland, S., Shaw, D.J., Mfinanga, S.G., Shirima, G., Kazwala, R.R., Eblate, E., Sharp, M., 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis* 87, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.03.001>
- Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis* -infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Veterinary Record* 162, 382–383. <https://doi.org/10.1136/vr.162.12.382>
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
- Collins, D.M., 2011. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, Special issue: 5th International Conference on *Mycobacterium bovis* 151, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.019>
- Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K.E., Kato-Maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S., Thwaites, G., Yeboah-Manu, D., Bothamley, G., Mei, J., Wei, L., Bentley, S., Harris, S.R., Niemann, S., Diel, R., Aseffa, A., Gao, Q., Young, D., Gagneux, S., 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 45, 1176–1182. <https://doi.org/10.1038/ng.2744>
- Comas, I., Homolka, S., Niemann, S., Gagneux, S., 2009. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLOS ONE* 4, e7815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007815>
- Comín, J., Otal, I., Samper, S., 2022. In-depth Analysis of IS6110 Genomic Variability in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Front Microbiol* 13, 767912. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.767912>
- Conceição, M.L. da, Conceição, E.C., Furlaneto, I.P., Silva, S.P. da, Guimaraes, A.E. dos S., Gomes, P., Boschiroli, M.L., Michelet, L., Kohl, T.A., Kranzer, K., Francez, L. da C., Lima, L.N.G.C., Portugal, I., Perdigão, J., Lima, K.V.B., 2020. Phylogenomic Perspective on a Unique *Mycobacterium bovis* Clade Dominating Bovine Tuberculosis Infections among Cattle and Buffaloes in Northern Brazil. *Sci Rep* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58398-5>
- Conlan, A.J.K., Vordermeier, M., de Jong, M.C., Wood, J.L., 2018. The intractable challenge of evaluating cattle vaccination as a control for bovine Tuberculosis. *eLife* 7, e27694. <https://doi.org/10.7554/eLife.27694>
- Corner, L., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary microbiology* 112, 303–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.015>
- Coscolla, M., Gagneux, S., Menardo, F., Loiseau, C., Ruiz-Rodriguez, P., Borrell, S., Otchere, I.D., Asante-Poku, A., Asare, P., Sánchez-Busó, L., Gehre, F., Sanoussi, C.N., Antonio, M., Affolabi, D., Fyfe, J., Beckert, P., Niemann, S., Alabi, A.S., Grobusch, M.P., Kobbe, R., Parkhill, J., Beisel, C., Fenner, L., Böttger, E.C., Meehan, C.J., Harris, S.R., de Jong, B.C., Yeboah-Manu, D., Brites, D., 2021. Phylogenomics of *Mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microb Genom* 7, 000477. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000477>
- Coscolla, M., Lewin, A., Metzger, S., Maetz-Rennsing, K., Calvignac-Spencer, S., Nitsche, A., Dabrowski, P.W., Radonic, A., Niemann, S., Parkhill, J., Couacy-Hymann, E., Feldman, J., Comas, I., Boesch, C., Gagneux, S., Leendertz, F.H., 2013. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolate from a Wild Chimpanzee. *Emerg Infect Dis* 19, 969–976. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121012>



- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4, 59–70.
- Costa, M.S., Vasconcellos, T., Barros, C., Callado, C., 2013. Does growth rhythm of a widespread species change in distinct growth sites? pp. 170–181. [https://doi.org/10.1163/9789004265608\\_014](https://doi.org/10.1163/9789004265608_014)
- Courcou, A., Moyen, J.-L., Brugère, L., Faye, S., Hénault, S., Gares, H., Boschioli, M.-L., 2014. Estimation of Sensitivity and Specificity of Bacteriology, Histopathology and PCR for the Confirmatory Diagnosis of Bovine Tuberculosis Using Latent Class Analysis. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090334>
- Cousins, D., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe Obe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D., Butler, W., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M., Alito, A., Zumarraga, M., Bernardelli, A., 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53, 1305–14. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02401-0>
- Cousins, D., Williams, S., Reuter, R., Forshaw, D., Chadwick, B., Coughran, D., Collins, P., Gales, N., 1993. Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Australian veterinary journal* 70, 92–7. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb03284.x>
- Cousins, D.V., Peet, R.L., Gaynor, W.T., Williams, S.N., Gow, B.L., 1994. Tuberculosis in imported hyrax (*Procapra capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology* 42, 135–145. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90013-2)
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S., de la Rua-Domenech, R., 2008. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *The Veterinary record* 163, 127. <https://doi.org/10.1136/vr.163.4.127>
- Crawshaw, T.R., Griffiths, I.B., Clifton-Hadley, R.S., 2008. Comparison of a standard and a detailed *postmortem* protocol for detecting *Mycobacterium bovis* in badgers. *Veterinary Record* 163, 473–477. <https://doi.org/10.1136/vr.163.16.473>
- Crispell, J., Cassidy, S., Kenny, K., McGrath, G., Warde, S., Cameron, H., Rossi, G., MacWhite, T., White, P.C.L., Lycett, S., Kao, R.R., Moriarty, J., Gordon, S.V., 2020. *Mycobacterium bovis* genomics reveals transmission of infection between cattle and deer in Ireland. *Microb Genom* 6, mgen000388. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000388>
- Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Sostaric, B., Spicic, S., Obrovac, M., Marjanovic, S., Benic, M., Kirin, B.K., Vickovic, I., 2007. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia [WWW Document]. URL <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtd/2007/00000011/00000006/art00011> (accessed 8.2.22).
- D’Alterio, G., Knowles, T., Eknaes, E., Loevland, I., Foster, A., 2006. Postal survey of the population of South American camelids in the United Kingdom in 2000/01. *The Veterinary record* 158, 86–90. <https://doi.org/10.1136/vr.158.3.86>
- D’Amore, R., Ijaz, U.Z., Schirmer, M., Kenny, J.G., Gregory, R., Darby, A.C., Shakya, M., Podar, M., Quince, C., Hall, N., 2016. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2194-9>
- Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M., Li, H., 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* 10, giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Darling, A.E., Tritt, A., Eisen, J.A., Facciotti, M.T., 2011. Mauve Assembly Metrics. *Bioinformatics* 27, 2756–2757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr451>
- Dawson, K.L., Bell, A., Kawakami, R.P., Coley, K., Yates, G., Collins, D.M., 2012. Transmission of *Mycobacterium orygis* (*M. tuberculosis* Complex Species) from a Tuberculosis Patient to a Dairy Cow in New Zealand. *J Clin Microbiol* 50, 3136–3138. <https://doi.org/10.1128/JCM.01652-12>
- de Azevedo Issa, M., Martins Soares Filho, P., Fonseca Júnior, A.A., Arrais Hodon, M., Cristian dos Santos, L., Karlisson Pimenta dos Reis, J., Cerqueira Leite, R., 2017. Comparative study of *Mycobacterium bovis* primary isolation methods. *Brazilian Journal of Microbiology* 48, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.026>
- de Jong, B.C., Antonio, M., Gagneux, S., 2010. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000744>
- de Jong, B.C., Hill, P.C., Aiken, A., Awine, T., Antonio, M., Adetifa, I.M., Jackson-Sillah, D.J., Fox, A., DeRiemer, K., Gagneux, S., Borgdorff, M.W., McAdam, K.P.W.J., Corrah, T., Small, P.M., Adegbola, R.A., 2008. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *M. tuberculosis* lineage in The Gambia. *J Infect Dis* 198, 1037–1043. <https://doi.org/10.1086/591504>

- de Jong, B.C., Hill, P.C., Brookes, R.H., Otu, J.K., Peterson, K.L., Small, P.M., Adegbola, R.A., 2005. *Mycobacterium africanum*: a new opportunistic pathogen in HIV infection? *AIDS* 19, 1714–1715. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000185991.54595.41>
- de la Fuente, J., Díez-Delgado, I., Contreras, M., Vicente, J., Cabezas-Cruz, A., Manrique, M., Tobes, R., López, V., Romero, B., Domínguez, L., Garrido, J.M., Juste, R., Gortazar, C., 2015. Complete Genome Sequences of Field Isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Genome Announc* 3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00247-15>
- de la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A., Vordermeier, H., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in veterinary science* 81, 190–210. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.11.005>
- Dean, G., Rhodes, S., Coad, M., Whelan, A., Cockle, P., Clifford, D., Hewinson, R., Vordermeier, M., 2005. Minimum Infective Dose of *Mycobacterium bovis* in Cattle. *Infection and immunity* 73, 6467–71. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6467-6471.2005>
- Deforges, L., Boulouis, H.J., Thibaud, J.L., Boulouha, L., Sougakoff, W., Blot, S., Hewinson, G., Truffot-Pernot, C., Haddad, N., 2004. First isolation of *Mycobacterium microti* (*Llama-type*) from a dog. *Veterinary Microbiology* 103, 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.06.016>
- Dejene, S.W., Heitkönig, I.M.A., Prins, H.H.T., Lemma, F.A., Mekonnen, D.A., Alemu, Z.E., Kelkay, T.Z., de Boer, W.F., 2016. Risk Factors for Bovine Tuberculosis (bTB) in Cattle in Ethiopia. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159083>
- Delafosse, A., Goutard, F., Thebaud, E., 2002. Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abéché, Tchad. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. <https://doi.org/10.19182/remvt.9846>
- Delahaye, C., Nicolas, J., 2021. Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PLOS ONE* 16, e0257521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257521>
- Delannoy, C., Huang, C., Coddeville, B., Chen, J.-Y., Mouajjah, D., Groux-Degroote, S., Harduin-Lepers, A., Khoo, K.-H., Guerardel, Y., Ellass-Rochard, E., 2020. *Mycobacterium bovis* BCG infection alters the macrophage N-glycome. *Mol. Omics* 16, 345–354. <https://doi.org/10.1039/C9MO00173E>
- Delavenne, C., Pandolfi, F., Girard, S., Réveillaud, É., Boschioli, M.-L., Dommergues, L., Garapin, F., Keck, N., Martin, F., Moussu, M., 2020. Tuberculose bovine: bilan et évolution de la situation épidémiologique entre 2015 et 2017 en France Métropolitaine. *Bull Epidemiol* 91, 12.
- Delogu, G., Sali, M., Fadda, G., 2013. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 5. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2013.070>
- Deun, A., Hossain, M., Gumusboga, M., Rieder, H., 2008. Ziehl-Neelsen staining: Theory and practice. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 12, 108–10.
- Dhama, K., Mahendran, M., Tiwari, R., Dayal Singh, S., Kumar, D., Singh, S., Sawant, P.M., 2011. Tuberculosis in birds: insights into the *Mycobacterium avium* infections. *Veterinary Medicine International* 2011.
- Dhungel, L., Benbow, M.E., Jordan, H.R., 2021. Linking the *Mycobacterium ulcerans* environment to Buruli ulcer disease: Progress and challenges. *One Health* 13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100311>
- Di Marco, V., Mazzone, P., Capucchio, M.T., Boniotti, M.B., Aronica, V., Russo, M., Fiasconaro, M., Cifani, N., Corneli, S., Biasibetti, E., Biagetti, M., Pacciarini, M.L., Cagiola, M., Pasquali, P., Marianelli, C., 2012. Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily. *J Clin Microbiol* 50, 1209–1218. <https://doi.org/10.1128/JCM.06544-11>
- Dippenaar, A., Parsons, S.D.C., Miller, M.A., Hlokwe, T., Gey van Pittius, N.C., Adroub, S.A., Abdallah, A.M., Pain, A., Warren, R.M., Michel, A.L., van Helden, P.D., 2017. Progenitor strain introduction of *Mycobacterium bovis* at the wildlife-livestock interface can lead to clonal expansion of the disease in a single ecosystem. *Infection, Genetics and Evolution* 51, 235–238. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.012>
- Domogalla, J., Prodinger, W.M., Blum, H., Krebs, S., Gellert, S., Müller, M., Neuendorf, E., Sedlmaier, F., Büttner, M., 2013. Region of Difference 4 in Alpine *Mycobacterium caprae* Isolates Indicates Three Variants. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.02966-12>
- Dong, H., Lv, Y., Sreevatsan, S., Zhao, D., Zhou, X., 2017. Differences in pathogenicity of three animal isolates of *Mycobacterium* species in a mouse model. *PloS one* 12, e0183666.
- Drewe, J., 2009. Who infects whom? Social networks and tuberculosis transmission in meerkats. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 277, 633–42. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1775>
- Drewe, J., O'connor, H., Weber, N., McDonald, R., Delahay, R., 2013. Patterns of direct and indirect contact between cattle and badgers naturally infected with tuberculosis. *Epidemiology & Infection* 141, 1467–1475.

- Drewe, J.A., Foote, A., Sutcliffe, R.L., Pearce, G., 2009. Pathology of *Mycobacterium bovis* Infection in Wild Meerkats (*Suricata suricatta*). Journal of comparative pathology 140, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.09.004>
- Driscoll, E.E., Hoffman, J.I., Green, L.E., Medley, G.F., Amos, W., 2011. A Preliminary Study of Genetic Factors That Influence Susceptibility to Bovine Tuberculosis in the British Cattle Herd. PLOS ONE 6, e18806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018806>
- Duault, H., Michelet, L., Boschioli, M.-L., Durand, B., Canini, L., 2022. A Bayesian evolutionary model towards understanding wildlife contribution to F4-family *Mycobacterium bovis* transmission in the South-West of France. Vet Res 53, 28. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01044-x>
- Duffield, B.J., Young, D.A., 1985. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. Veterinary Microbiology 10, 193–197. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(85\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(85)90021-5)
- Duffy, S.C., Srinivasan, S., Schilling, M.A., Stuber, T., Danchuk, S.N., Michael, J.S., Venkatesan, M., Bansal, N., Maan, S., Jindal, N., Chaudhary, D., Dandapat, P., Katani, R., Chothe, S., Veerasami, M., Robbe-Austerman, S., Juleff, N., Kapur, V., Behr, M.A., 2020. Reconsidering *Mycobacterium bovis* as a proxy for zoonotic tuberculosis: a molecular epidemiological surveillance study. Lancet Microbe 1, e66–e73. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30038-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30038-0)
- Dürr, S., Müller, B., Alonso, S., Hattendorf, J., Laise, C.J., Van Helden, P.D., Zinsstag, J., 2013. Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review. PLoS neglected tropical diseases 7, e2399.
- Ealand, C., Rimal, B., Chang, J., Mashigo, L., Chengalroyen, M., Mapela, L., Beukes, G., Machowski, E., Kim, S.J., Kana, B., 2018. Resuscitation-Promoting Factors Are Required for *Mycobacterium smegmatis* Biofilm Formation. Appl Environ Microbiol 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00687-18>
- Eldholm, V., Rønning, J.O., Mengshoel, A.T., Arnesen, T., 2021. Import and transmission of *Mycobacterium orygis* and *Mycobacterium africanum*, Norway. BMC Infect Dis 21, 562. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06269-3>
- Elton, C., Davis, D.H.S., Findlay, G.M., 1935. An Epidemic among Voles (*Microtus agrestis*) on the Scottish Border in the Spring of 1934. Journal of Animal Ecology 4, 277–288. <https://doi.org/10.2307/1018>
- Emmanuel, F.X., Seagar, A.-L., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P., Laurenson, I., 2007. Human and Animal Infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. Emerg Infect Dis 13, 1924–1927. <https://doi.org/10.3201/eid1312.061536>
- Erwin, P.C., Bemis, D.A., Mawby, D.I., McCombs, S.B., Sheeler, L.L., Himelright, I.M., Halford, S.K., Diem, L., Metchock, B., Jones, T.F., Schilling, M.G., Thomsen, B.V., 2004. *Mycobacterium tuberculosis* Transmission from Human to Canine. Emerg Infect Dis 10, 2258–2260. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040094>
- Etchechoury, I., Valencia, G.E., Morcillo, N., Sequeira, M.D., Imperiale, B., López, M., Caimi, K., Zumárraga, M.J., Cataldi, A., Romano, M.I., 2010. Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates in Argentina: First Description of a Person-to-Person Transmission Case. Zoonoses and Public Health 57, 375–381. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01233.x>
- Euzéby, J.P., 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Int J Syst Bacteriol 47, 590–592. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>
- Fabre, M., Koeck, J.-L., Flèche, P.L., Simon, F., Hervé, V., Vergnaud, G., Pourcel, C., 2004. High Genetic Diversity Revealed by Variable-Number Tandem Repeat Genotyping and Analysis of *hsp65* Gene Polymorphism in a Large Collection of “*Mycobacterium canettii*” Strains Indicates that the *M. tuberculosis* Complex Is a Recently Emerged Clone of “*M. canettii*.” Journal of Clinical Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3248-3255.2004>
- Falkinham, J.O., 2016. Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous Mycobacteria (NTM). Curr Envir Health Rpt 3, 161–167. <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0086-z>
- Falkinham, J.O., Hilborn, E.D., Arduino, M.J., Pruden, A., Edwards, M.A., 2015. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Health Perspect 123, 749–758. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408692>
- Fang, Z., Doig, C., Kenna, D.T., Smittipat, N., Palittapongarnpim, P., Watt, B., Forbes, K.J., 1999. IS6110-Mediated Deletions of Wild-Type Chromosomes of *Mycobacterium tuberculosis*. J. BACTERIOL. 181, 7.
- Fennelly, K., Martyny, J., Fulton, K., Orme, I., Cave, D., Heifets, L., 2004. Cough-Generated Aerosols of *Mycobacterium tuberculosis*: A New Method to Study Infectiousness. American journal of respiratory and critical care medicine 169, 604–9. <https://doi.org/10.1164/rccm.200308-1101OC>
- Feuerriegel, S., Köser, C.U., Richter, E., Niemann, S., 2013. *Mycobacterium canettii* is intrinsically resistant to both pyrazinamide and pyrazinoic acid. J Antimicrob Chemother 68, 1439–1440. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt042>

- Feverheiro, J., Fraga, A., Pedrosa, J., 2021. Genetics in the Host-*Mycobacterium ulcerans* interaction. *Immunological Reviews* 301. <https://doi.org/10.1111/imr.12958>
- Fine, A., Bolin, C., Gardiner, J., Kaneene, J., 2011. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Veterinary medicine international* 2011, 765430. <https://doi.org/10.4061/2011/765430>
- Fischer, E.A.J., van Roermund, H.J.W., Hemerik, L., van Asseldonk, M.A.P.M., de Jong, M.C.M., 2005. Evaluation of surveillance strategies for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) using an individual based epidemiological model. *Preventive Veterinary Medicine* 67, 283–301. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.12.002>
- Fishbein, S., Wyk, N. van, Warren, R.M., Sampson, S.L., 2015. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Molecular Microbiology* 96, 901–916. <https://doi.org/10.1111/mmi.12981>
- Flamand, J. R. B., Delhomme, A., Ancrenaz, M., 1994. Hand-rearing the Arabian oryx *Oryx leucoryx*: at the National Wildlife Research Center, Saudi Arabia. *International Zoo Yearbook* 33, 269–274. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1994.tb03581.x>
- Flamand, J.R.B., Greth, A., Haagsma, J., Griffin, F., 1994. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *The Veterinary record* 134, 115–8. <https://doi.org/10.1136/vr.134.5.115>
- Floto, R.A., Olivier, K.N., Saiman, L., Daley, C.L., Herrmann, J.-L., Nick, J.A., Noone, P.G., Bilton, D., Corris, P., Gibson, R.L., 2016. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* 71, i1–i22.
- Fomukong, N., Beggs, M., El Hajj, H., Templeton, G., Eisenach, K., Cave, M.D., 1998. Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tubercle and Lung Disease* 78, 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0962-8479\(98\)80003-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8479(98)80003-8)
- Forbes, B.A., Hall, G.S., Miller, M.B., Novak, S.M., Rowlinson, M.-C., Salfinger, M., Somoskövi, A., Warshauer, D.M., Wilson, M.L., 2018. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17>
- Forfait, C., Boschioli, M.-L., Carles, S., Chaigneau, P., Dufour, B., Dupuy, C., Durand, B., Gache, K., Garapin, F., Keck, N., Moussu, M., Philizot, S., Pieus, A., Rambaud, T., Ravise, J.F., Réveillaud, É., Richomme, C., Rivière, J., Chevalier, F., Desvaux, S., 2022. Surveillance de la tuberculose due à *Mycobacterium bovis* en France métropolitaine pour la campagne 2019-2020 : résultats et indicateurs de fonctionnement.
- Forrellad, M.A., Klepp, L.I., Gioffré, A., García, J.S. y, Morbidoni, H.R., Santangelo, M. de la P., Cataldi, A.A., Bigi, F., 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 4, 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.22329>
- Forshaw, D., Phelps, G.R., 1991. TUBERCULOSIS IN A CAPTIVE COLONY OF PINNIPEDS. *Journal of Wildlife Diseases* 27, 288–295. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-27.2.288>
- Fox, E.J., Reid-Bayliss, K.S., Emond, M.J., Loeb, L.A., 2014. Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next Gen Genom Appl* 1, 1000106. <https://doi.org/10.4172/jngsa.1000106>
- Francis, J., 1958. Tuberculosis in Animals and Man. A Study In Comparative Pathology.
- Frank, W., Reisinger, E.C., Brandt-Hamerla, W., Schwede, I., Handrick, W., 2009. *Mycobacterium microti* – pulmonary tuberculosis in an immunocompetent patient. *Wien Klin Wochenschr* 121, 282. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1164-0>
- Freidlin, P.J., Nissan, I., Luria, A., Goldblatt, D., Schaffer, L., Kaidar-Shwartz, H., Chemtob, D., Dveyrin, Z., Head, S.R., Rorman, E., 2017. Structure and variation of CRISPR and CRISPR-flanking regions in deleted-direct repeat region *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3560-6>
- Frolov, A.S., Pika, I.S., Eroshkin, A.M., 1997. ProMSED: protein multiple sequence editor for Windows 3.11/95. *Bioinformatics* 13, 243–248. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/13.3.243>
- Frota, C., 2004. Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology* 150, 1519–1527. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26660-0>
- Frothingham, R., Strickland, P.L., Bretzel, G., Ramaswamy, S., Musser, J.M., Williams, D.L., 1999. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Mycobacterium africanum* Isolates from West Africa. *J Clin Microbiol* 37, 1921–1926.
- Gagneux, S., 2017. Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7>
- Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, X., Zhang, J., Zhang, Y., 2017. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology* 18, 13. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1144-4>

- Garbaccio, S., Macias, A., Shimizu, E., Paolicchi, F., Pezzone, N., Magnano, G., Zapata, L., Abdala, A., Tarabla, H., Peyru, M., 2014. Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Virulence* 5, 297–302.
- García, E.A., Blanco, F.C., Klepp, L.I., Pazos, A., McNeil, M.R., Jackson, M., Bigi, F., 2021. 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>
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>
- Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Boadella, M., Lyashchenko, K.P., Romero, B., Geijo, M.V., Ruiz-Fons, F., Aranaz, A., Juste, R.A., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Protection against Tuberculosis in Eurasian Wild Boar Vaccinated with Heat-Inactivated *Mycobacterium bovis*. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024905>
- Garrison, E., Kronenberg, Z.N., Dawson, E.T., Pedersen, B.S., Prins, P., 2022. A spectrum of free software tools for processing the VCF variant call format: vcflib, bio-vcf, cyvcf2, hts-nim and slivar. *PLoS Comput Biol* 18, e1009123. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009123>
- Gay, G., Burbidge, H., Bennett, P., Fenwick, S., Dupont, C., Murray, A., Alley, M., 2000. Pulmonary *Mycobacterium Bovis* infection in a dog. *New Zealand veterinary journal* 48, 78–81. <https://doi.org/10.1080/00480169.2000.36164>
- Gey van Pittius, N.C., van Helden, P.D., Warren, R.M., 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerg Infect Dis* 18, 1708–1709. <https://doi.org/10.3201/eid1810.120569>
- Ghielmetti, G., Hilbe, M., Friedel, U., Menegatti, C., Bacciarini, L., Stephan, R., Bloemberg, G., 2021. Mycobacterial infections in wild boars (*Sus scrofa*) from Southern Switzerland: Diagnostic improvements, epidemiological situation and zoonotic potential. *Transbound Emerg Dis* 68, 573–586. <https://doi.org/10.1111/tbed.13717>
- Gibson, A., Stiens, J., Passmore, I., Faulkner, V., Miculob, J., Willcocks, S., Coad, M., Berg, S., Werling, D., Wren, B., Nobeli, I., Villarreal-Ramos, B., Kendall, S., 2022. Defining the genes required for survival of *Mycobacterium bovis* in the bovine host offers novel insights into the genetic basis of survival of pathogenic mycobacteria. <https://doi.org/10.1101/2022.03.15.484275>
- Goh, K.S., Legrand, E., Sola, C., Rastogi, N., 2001. Rapid Differentiation of “*Mycobacterium canettii*” from Other *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms by PCR-Restriction Analysis of the hsp65 Gene. *J Clin Microbiol* 39, 3705–3708. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3705-3708.2001>
- Golby, P., Nunez, J., Witney, A., Hinds, J., Quail, M.A., Bentley, S., Harris, S., Smith, N., Hewinson, R.G., Gordon, S.V., 2013. Genome-level analyses of *Mycobacterium bovis* lineages reveal the role of SNPs and antisense transcription in differential gene expression. *BMC Genomics* 14, 710. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-710>
- Goldstein, S., Beka, L., Graf, J., Klassen, J.L., 2019. Evaluation of strategies for the assembly of diverse bacterial genomes using MinION long-read sequencing. *BMC Genomics* 20, 23. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5381-7>
- Gong, W., Liang, Y., Wu, X., 2018. The current status, challenges, and future developments of new tuberculosis vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 14, 1697–1716. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1458806>
- Gong, W.-P., Liang, Y., Ling, Y.-B., Zhang, J.-X., Yang, Y.-R., Wang, L., Wang, J., Shi, Y.-C., Wu, X.-Q., 2020. Effects of *Mycobacterium vaccae* vaccine in a mouse model of tuberculosis: protective action and differentially expressed genes. *Mil Med Res* 7. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00258-4>
- Gonzalo-Asensio, J., Pérez, I., Aguiló, N., Uranga, S., Picó, A., Lampreave, C., Cebollada, A., Otal, I., Samper, S., Martín, C., 2018. New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages. *PLoS Genet.* 14, e1007282. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007282>
- Goodchild, A.V., Clifton-Hadley, R.S., 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 81, 23–41. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0256>
- Goodwin, S., Gurtowski, J., Ethe-Sayers, S., Deshpande, P., Schatz, M.C., McCombie, W.R., 2015. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. *Genome research* 25, 1750–1756.
- Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R., 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17, 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Cole, S.T., 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular Microbiology* 32, 643–655. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01383.x>

- Gormley, E., Corner, L. a. L., 2013. Control Strategies for Wildlife Tuberculosis in Ireland. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 128–135. <https://doi.org/10.1111/tbed.12095>
- Gormley, E., Corner, L.A., 2018. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection: the badger model as a paradigm for understanding tuberculosis in animals. *Frontiers in Veterinary Science* 4, 247.
- Gormley, E., Corner, L.A.L., 2017. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* Infection: the Badger Model As a Paradigm for Understanding Tuberculosis in Animals. *Frontiers in Veterinary Science* 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00247>
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J.D., 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Veterinary Microbiology*, 4th International Conference on *Mycobacterium bovis* 112, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.029>
- Gormley, E., Ní Bhuachalla, D., Fitzsimons, T., O’Keeffe, J., McGrath, G., Madden, J.M., Fogarty, N., Kenny, K., Messam, L.L.McV., Murphy, D., Corner, L.A.L., 2022. Protective immunity against tuberculosis in a free-living badger population vaccinated orally with *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guérin. *Transboundary and Emerging Diseases* 69, e10–e19. <https://doi.org/10.1111/tbed.14254>
- Gortázar, C., Delahay, R.J., Mcdonald, R.A., Boadella, M., Wilson, G.J., GAVIER-WIDEN, D., Acevedo, P., 2012. The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mammal Review* 42, 193–206.
- Gortazar, C., Vicente, J., Boadella, M., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Garrido, J., Aranaz, A., de la Fuente, J., 2011. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary Microbiology*, Special issue: 5th International Conference on *Mycobacterium bovis* 151, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.041>
- Gortazar, C., Vicente, J., Gavier-Widen, D., 2003. Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *The Veterinary Record* 152, 779–780.
- Greth, A., Flamand, J.R.B., Delhomme, A., 1994. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): Management. *The Veterinary record* 134, 165–7. <https://doi.org/10.1136/vr.134.7.165>
- Griffin, J.F.T., 2000. Veterinary Tuberculosis Vaccine Development. *Clinical Infectious Diseases* 30, S223–S228.
- Griffin, J.M., Haesy, T., Lynch, K., Salman, M.D., McCarthy, J., Hurley, T., 1993. The association of cattle husbandry practices, environmental factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 17, 145–160. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(93\)90025-O](https://doi.org/10.1016/0167-5877(93)90025-O)
- Griffin, J.M., Martin, S.W., Thorburn, M.A., Eves, J.A., Hammond, R.F., 1996. A case-control study on the association of selected risk factors with the occurrence of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 27, 75–87. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(95\)00548-X](https://doi.org/10.1016/0167-5877(95)00548-X)
- Grissa, I., Bouchon, P., Pourcel, C., Vergnaud, G., 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie, Recent advances in complete genome analysis* 90, 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.014>
- Grissa, I., Vergnaud, G., Pourcel, C., 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 8, 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>
- Guimaraes, A.M.S., Zimpel, C.K., 2020. *Mycobacterium bovis*: From Genotyping to Genome Sequencing. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050667>
- Gunn-Moore, D., Jenkins, P., Lucke, V., 1996. Feline tuberculosis: A literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. *The Veterinary record* 138, 53–8. <https://doi.org/10.1136/vr.138.3.53>
- Gupta, R.S., Lo, B., Son, J., 2018. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol* 9, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., Vincent, V., 2005. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathogens* 1, e5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005>
- Guyeux, C., Sola, C., Noûs, C., Refrégier, G., 2021. CRISPRbuilder-TB: “CRISPR-builder for tuberculosis”. Exhaustive reconstruction of the CRISPR locus in *mycobacterium tuberculosis* complex using SRA. *PLoS Comput Biol* 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008500>
- Hackendahl, N.C., Mawby, D.I., Bemis, D.A., Beazley, S.L., 2004. Putative transmission of *Mycobacterium tuberculosis* infection from a human to a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 225, 1573–1577. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.225.1573>

- Haddad, N., Ostyn, A., Karoui, C., Masselot, M., Thorel, M.F., Hughes, S.L., Inwald, J., Hewinson, R.G., Durand, B., 2001. Spoligotype Diversity of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in France from 1979 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3623–3632. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3623-3632.2001>
- Halse, T.A., Escuyer, V.E., Musser, K.A., 2011. Evaluation of a Single-Tube Multiplex Real-Time PCR for Differentiation of Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 49, 2562–2567. <https://doi.org/10.1128/JCM.00467-11>
- Hamed, Y.K., Nasr, E., Azooz, M.F., Youssef, H.M., 2021. Prevalence and risk factors of bovine tuberculosis in dairy cattle farms in Egypt. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 35, 351–359. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2020.126850.1399>
- Hancock, J.M., 1995. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *J Mol Evol* 41, 1038–1047. <https://doi.org/10.1007/BF00173185>
- Harris, M., Reza, J., 2012. Global report for research on infectious diseases of poverty. World Health Organization.
- Hars, J., Boschirolu, M.-L., Duvauchelle, A., Garin-Bastuji, B., 2006. La tuberculose à *Mycobacterium bovis* chez le cerf et le sanglier en France. Émergence et risque pour l'élevage bovin. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 159, 393–401. <https://doi.org/10.4267/2042/58198>
- Hars, J., Richomme, C., Rivière, J., Payne, A., Faure, E., Boschirolu, M.-L., 2013. La tuberculose bovine dans la faune sauvage en France. Risques pour l'élevage bovin. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 166, 222–228.
- Hauer, A., De Cruz, K., Cochard, T., Godreuil, S., Karoui, C., Henault, S., Bulach, T., Bañuls, A.-L., Biet, F., Boschirolu, M.L., 2015. Genetic Evolution of *Mycobacterium bovis* Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117103>
- Hauer, A., Michelet, L., Cochard, T., Branger, M., Nunez, J., Boschirolu, M.-L., Biet, F., 2019. Accurate Phylogenetic Relationships Among *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in France Based on Whole Genome Sequencing and Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Front Microbiol* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00955>
- Hauer, A., Michelet, L., De Cruz, K., Cochard, T., Branger, M., Karoui, C., Henault, S., Biet, F., Boschirolu, M.L., 2016. MIRU-VNTR allelic variability depends on *Mycobacterium bovis* clonal group identity. *Infection, Genetics and Evolution* 45, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.038>
- Hawkey, J., Hamidian, M., Wick, R.R., Edwards, D.J., Billman-Jacobe, H., Hall, R.M., Holt, K.E., 2015. ISMapper: identifying transposase insertion sites in bacterial genomes from short read sequence data. *BMC Genomics* 16. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1860-2>
- Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases* 8, 1468–1473.
- He, L., Fan, X., Xie, J., 2012. Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas. *Journal of Cellular Biochemistry* 113, 2464–2473. <https://doi.org/10.1002/jcb.24121>
- Helden, P., Parsons, S., Gey van Pittius, N., 2009. “Emerging” mycobacteria in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 80, 210–4.
- Hénault, S., Karoui, C., Boschirolu, M.-L., 2006. A PCR-based method for tuberculosis detection in wildlife. *Developments in biologicals* 126, 123–32; discussion 325.
- Hermans, P.W., van Soolingen, D., Dale, J.W., Schuitema, A.R., McAdam, R.A., Catty, D., van Embden, J.D., 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28, 2051–2058.
- Hirano, K., Aono, A., Takahashi, M., Abe, C., 2004. Mutations Including IS6110 Insertion in the Gene Encoding the MPB64 Protein of Capilia TB-Negative *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Clin Microbiol* 42, 390–392. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.390-392.2004>
- Hoefsloot, W., Ingen, J. van, Andrejak, C., Ångeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Beylis, N., Boeree, M.J., Cacho, J., Chihota, V., Chimara, E., Churchyard, G., Cias, R., Dasa, R., Daley, C.L., Dekhuijzen, P.N.R., Domingo, D., Drobniowski, F., Esteban, J., Fauville-Dufaux, M., Folkvardsen, D.B., Gibbons, N., Gómez-Mampaso, E., Gonzalez, R., Hoffmann, H., Hsueh, P.R., Indra, A., Jagielski, T., Jamieson, F., Jankovic, M., Jong, E., Keane, J., Koh, W.J., Lange, B., Leao, S., Macedo, R., Mannsåker, T., Marras, T.K., Maugein, J., Milburn, H.J., Mlinkó, T., Morcillo, N., Morimoto, K., Papaventsis, D., Palenque, E., Paez-Peña, M., Piersimoni, C., Polanová, M., Rastogi, N., Richter, E., Ruiz-Serrano, M.J., Silva, A., Silva, M.P. da, Simsek, H., Soolingen, D. van, Szabó, N., Thomson, R., Fernandez, M.T.T., Tortoli, E., Totten, S.E., Tyrrell, G., Vasankari, T., Villar, M., Walkiewicz, R., Winthrop, K., Wagner, D., NTM-NET (www.ntm-net.org), F., 2013. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: A NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/09031936.00149212>
- Horstkotte, M.A., Sobottka, I., Schewe, C.K., Schäfer, P., Laufs, R., Rüscher-Gerdes, S., Niemann, S., 2001. *Mycobacterium microti* Llama-Type Infection Presenting as Pulmonary Tuberculosis in a Human

- Immunodeficiency Virus-Positive Patient. *J Clin Microbiol* 39, 406–407. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.406-407.2001>
- Howard, S.T., Oughton, M.T., Haddad, A., Johnson, W.M., 1998. Absence of the genetic marker *IS6110* from a strain of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Ontario. *Can J Infect Dis* 9, 48–53.
- Huard, R., Fabre, M., Haas, P., Lazzarini, L., Soolingen, D., Cousins, D., Ho, J., 2006. Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of bacteriology* 188, 4271–87. <https://doi.org/10.1128/JB.01783-05>
- Huard, R.C., de Oliveira Lazzarini, L.C., Butler, W.R., van Soolingen, D., Ho, J.L., 2003. PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *J Clin Microbiol* 41, 1637–1650. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1637-1650.2003>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S.K., Cook, H., Mende, D.R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2019. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research* 47, D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Humblet, M.-F., Boschirolu, M.L., Saegerman, C., 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet. Res.* 40, 1–24. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009033>
- Humblet, M.-F., Gilbert, M., Govaerts, M., Fauville-Dufaux, M., Walravens, K., Saegerman, C., 2010. New Assessment of Bovine Tuberculosis Risk Factors in Belgium Based on Nationwide Molecular Epidemiology. *J Clin Microbiol* 48, 2802–2808. <https://doi.org/10.1128/JCM.00293-10>
- Hunt, M., Silva, N.D., Otto, T.D., Parkhill, J., Keane, J.A., Harris, S.R., 2015. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biology* 16, 294. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0849-0>
- Huyen, M.N.T., Tiemersma, E.W., Kremer, K., de Haas, P., Lan, N.T.N., Buu, T.N., Sola, C., Cobelens, F.G.J., van Soolingen, D., 2013. Characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates lacking *IS6110* in Viet Nam [WWW Document]. <https://doi.org/10.5588/ijtld.13.0149>
- Inangolet, F.O., Demelash, B., Oloya, J., Opuda-Asibo, J., Skjerve, E., 2008. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in the transhumant and agro-pastoral cattle herds in the border areas of Katakwi and Moroto districts, Uganda. *Trop Anim Health Prod* 40, 501–508. <https://doi.org/10.1007/s11250-007-9126-x>
- Ingen, J.V., Boeree, M.J., Dekhuijzen, P.N.R., Soolingen, D.V., 2009. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 888–893. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03013.x>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169, 5429–5433.
- Jamin, C., Rivière, J., 2020. Assessment of bovine tuberculosis surveillance effectiveness in French wildlife: An operational approach. *Preventive Veterinary Medicine* 175, 104881. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104881>
- Jansen, R., Embden, J.D.A. van, Gastra, W., Schouls, L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43, 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Johnson, L., Dean, G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A., 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 87, 71–6. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.04.002>
- Jong, B.C. de, Antonio, M., Gagneux, S., 2010. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, e744. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000744>
- Junqueira-Kipnis, A.P., de Oliveira, F.M., Trentini, M.M., Tiwari, S., Chen, B., Resende, D.P., Silva, B.D.S., Chen, M., Tesfa, L., Jacobs, W.R., Kipnis, A., 2013. Prime-Boost with *Mycobacterium smegmatis* Recombinant Vaccine Improves Protection in Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078639>
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Agterveld, M. van, Soolingen, D. van, Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., Embden, J. van, 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 907–914.
- Kana, B.D., Gordhan, B.G., Downing, K.J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E.E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G., Mizrahi, V., 2008. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol Microbiol* 67, 672–684. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06078.x>



- Kao, R., Price-Carter, M., ROBBE-AUSTERMAN, S., 2016. Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission: -EN- -FR- L'utilisation de la génomique pour retracer la transmission de la tuberculose bovine -ES- Uso de la genómica para rastrear la transmisión de la tuberculosis bovina. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 35, 241–268. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2430>
- Karakousis, P.C., Moore, R.D., Chaisson, R.E., 2004. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *The Lancet Infectious Diseases* 4, 557–565. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01130-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01130-2)
- Kean, J.M., Barlow, N.D., Hickling, G.J., 1999. Evaluating potential sources of bovine tuberculosis infection in a New Zealand cattle herd. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 42, 101–106. <https://doi.org/10.1080/00288233.1999.9513358>
- Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., Van Soolingen, D., Koëter, G., 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals [WWW Document]. URL <https://www.ingentaconnect.com/contentone/iatld/ijtd/2008/00000012/00000012/art00022> (accessed 8.2.22).
- King, H., Murphy, A., James, P., Travis, E., Porter, D., Hung, Y., Sawyer, J., Cork, J., Delahay, R., Gaze, W., Courtenay, O., Wellington, E. m. h., 2015. The variability and seasonality of the environmental reservoir of *Mycobacterium bovis* shed by wild European badgers. *Scientific Reports* 5. <https://doi.org/10.1038/srep12318>
- Koch, R., 1982. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Reviews of infectious diseases* 4, 1270–4.
- Kock, R., Michel, A., Yeboah-Manu, D., Azhar, E., Torrelles, J., Cadmus, S., Brunton, L.A., Chakaya, J., Marais, B., Mboera, L., Rahim, Z., Haider, N., Zumla, A., 2021. Zoonotic Tuberculosis – The Changing Landscape. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.091>
- Koeck, J.-L., Fabre, M., Simon, F., Daffé, M., Garnotel, E., Matan, A.B., Gérôme, P., Bernatas, J.-J., Buisson, Y., Pourcel, C., 2011. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli “*Mycobacterium canettii*” infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 1013–9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03347.x>
- Kohl, T.A., Kranzer, K., Andres, S., Wirth, T., Niemann, S., Moser, I., 2020. Population Structure of *Mycobacterium bovis* in Germany: a Long-Term Study Using Whole-Genome Sequencing Combined with Conventional Molecular Typing Methods. *J Clin Microbiol* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.01573-20>
- Kohl, T.A., Utpatel, C., Schleusener, V., Filippo, M.R.D., Beckert, P., Cirillo, D.M., Niemann, S., 2018. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ* 6, e5895. <https://doi.org/10.7717/peerj.5895>
- Koren, S., Schatz, M.C., Walenz, B.P., Martin, J., Howard, J.T., Ganapathy, G., Wang, Z., Rasko, D.A., McCombie, W.R., Jarvis, E.D., 2012. Hybrid error correction and *de novo* assembly of single-molecule sequencing reads. *Nature biotechnology* 30, 693–700.
- Kuenstner, J.T., Naser, S., Chamberlin, W., Borody, T., Graham, D.Y., McNeese, A., Hermon-Taylor, J., Hermon-Taylor, A., Dow, C.T., Thayer, W., Biesecker, J., Collins, M.T., Sechi, L.A., Singh, S.V., Zhang, P., Shafran, I., Weg, S., Telega, G., Rothstein, R., Oken, H., Schimpff, S., Bach, H., Bull, T., Grant, I., Ellingson, J., Dahmen, H., Lipton, J., Gupta, S., Chaubey, K., Singh, M., Agarwal, P., Kumar, A., Misri, J., Sohal, J., Dhama, K., Hemati, Z., Davis, W., Hier, M., Aitken, J., Pierce, E., Parrish, N., Goldberg, N., Kali, M., Bendre, S., Agrawal, G., Baldassano, R., Linn, P., Sweeney, R.W., Fecteau, M., Hofstaedter, C., Potula, R., Timofeeva, O., Geier, S., John, K., Zayanni, N., Malaty, H.M., Kahlenborn, C., Kravitz, A., Bulfon, A., Daskalopoulos, G., Mitchell, H., Neilan, B., Timms, V., Cossu, D., Mameli, G., Angermeier, P., Jelic, T., Goethe, R., Juste, R.A., Kuenstner, L., 2017. The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) Conference 2017. *Front Public Health* 5, 208. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00208>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lambert, S., Hars, J., Réveillaud, E., Moyon, J.-L., Gares, H., Rambaud, T., Gueneau, E., Faure, E., Boschioli, M.-L., Richomme, C., 2017. Host status of wild roe deer in bovine tuberculosis endemic areas. *European Journal of Wildlife Research* 63, 1–9.
- Langton, T.E., Jones, M.W., McGill, I., 2022. Analysis of the impact of badger culling on bovine tuberculosis in cattle in the high-risk area of England, 2009–2020. *Veterinary Record* 190, e1384.
- Lantos, Á., Niemann, S., Mezösi, L., Sós, E., Erdélyi, K., Dávid, S., Parsons, L.M., Kubica, T., Rüscher-Gerdes, S., Somoskövi, Á., 2003. Pulmonary Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Captive Siberian Tiger. *Emerg Infect Dis* 9, 1462–1464. <https://doi.org/10.3201/eid0911.030297>

- Laprie, C., Duboy, J., Malik, R., Fyfe, J., 2013. Feline cutaneous mycobacteriosis: A review of clinical, pathological and molecular characterization of one case of *Mycobacterium microti* skin infection and nine cases of feline leprosy syndrome from France and New Caledonia. *Veterinary dermatology* 24. <https://doi.org/10.1111/vde.12066>
- Larenas-Muñoz, F., Sánchez-Carvajal, J.M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Vera-Salmoral, E., Gómez-Gascón, L., Maldonado, A., Carrasco, L., Tarradas, C., Luque, I., Rodríguez-Gómez, I.M., Gómez-Laguna, J., 2022. The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. *Frontiers in Veterinary Science* 9.
- Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, I.L., Poli, G., Bonizzi, L., 2000. Evaluation of the Specificity of the  $\gamma$ -Interferon Test in Italian Bovine Tuberculosis-free Herds. *The Veterinary Journal* 160, 17–24. <https://doi.org/10.1053/tvj.1999.0444>
- le Roex, N., van Helden, P.D., Koets, A.P., Hoal, E.G., 2013. Bovine TB in livestock and wildlife: what's in the genes? *Physiological Genomics* 45, 631–637. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00061.2013>
- Lee, J.S., Krause, R., Schreiber, J., Mollenkopf, H.-J., Kowall, J., Stein, R., Jeon, B.-Y., Kwak, J.-Y., Song, M.-K., Patron, J.P., Jorg, S., Roh, K., Cho, S.-N., Kaufmann, S.H.E., 2008. Mutation in the Transcriptional Regulator *PhoP* Contributes to Avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra Strain. *Cell Host & Microbe* 3, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.01.002>
- Lee, R.S., Behr, M.A., 2016. Does Choice Matter? Reference-Based Alignment for Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 54, 1891–1895. <https://doi.org/10.1128/JCM.00364-16>
- Lesellier, S., Birch, C.P.D., Davé, D., Dalley, D., Gowtage, S., Palmer, S., McKenna, C., Williams, G.A., Ashford, R., Weyer, U., Beatham, S., Coats, J., Nunez, A., Sanchez-Cordon, P., Spiropoulos, J., Powell, S., Sawyer, J., Pascoe, J., Hendon-Dunn, C., Bacon, J., Chambers, M.A., 2020. Bioreactor-Grown Bacillus of Calmette and Guérin (BCG) Vaccine Protects Badgers against Virulent *Mycobacterium bovis* When Administered Orally: Identifying Limitations in Baited Vaccine Delivery. *Pharmaceutics* 12, 782. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080782>
- Letunic, I., Bork, P., 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127–128. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, L., Faucher, S.P., 2017. Role of the LuxR family transcriptional regulator Lpg2524 in the survival of *Legionella pneumophila* in water. *Can. J. Microbiol.* 63, 535–545. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0780>
- Li, Y., Peng, N., 2019. Endogenous CRISPR-Cas System-Based Genome Editing and Antimicrobials: Review and Prospects. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02471>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems [WWW Document]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Logsdon, G.A., Vollger, M.R., Eichler, E.E., 2020. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nature Reviews Genetics* 21, 597–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0236-x>
- Loiseau, C., Menardo, F., Aseffa, A., Hailu, E., Gumi, B., Ameni, G., Berg, S., Rigouts, L., Robbe-Austerman, S., Zinsstag, J., Gagneux, S., Brites, D., 2020. An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evol Med Public Health* 2020, 49–59. <https://doi.org/10.1093/emph/eoaa005>
- Lok, K.H., Benjamin, W.H., Kimerling, M.E., Pruitt, V., Lathan, M., Razeq, J., Hooper, N., Cronin, W., Dunlap, N.E., 2002. Molecular Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Strains without IS6110 Insertions. *Emerg Infect Dis* 8, 1310–1313. <https://doi.org/10.3201/eid0811.020291>
- Loman, N.J., Quick, J., Simpson, J.T., 2015. A complete bacterial genome assembled *de novo* using only nanopore sequencing data. *Nature Methods* 12, 733–735. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3444>
- Lombardi, G., Botti, I., Pacciarini, M.L., Boniotti, M.B., Roncarati, G., Monte, P.D., 2017. Five-year surveillance of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in Bologna, Italy: an underestimated problem. *Epidemiology & Infection* 145, 3035–3039. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001996>
- Lomme, J., Thoen, C., Himes, E., Vinson, J., King, R., 1976. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 169, 912–4.
- Lorente-Leal, V., Farrell, D., Romero, B., Álvarez, J., Juan, L. de, Gordon, S.V., 2021. Performance and Agreement Between WGS Variant Calling Pipelines Used for Bovine Tuberculosis Control: Toward International Standardization. *Frontiers in Veterinary Science* 8.
- Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L., Romero, B., 2019. Validation of a Real-Time PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members in Bovine Tissue Samples. *Front Vet Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00061>

- Loudon, R., Roberts, R., 1967. Droplet Expulsion from the Respiratory Tract. *The American review of respiratory disease* 95, 435–42. <https://doi.org/10.1164/arrd.1967.95.3.435>
- Loukil, A., Bouzid, F., Osman, D.A., Drancourt, M., 2019. Decrypting the environmental sources of *Mycobacterium canettii* by high-throughput biochemical profiling. *PLoS One* 14, e0222078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222078>
- Louwen, R., Staals, R.H.J., Endtz, H.P., van Baarlen, P., van der Oost, J., 2014. The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78, 74–88. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00039-13>
- Luo, T., Yang, C., Gagneux, S., Gicquel, B., Mei, J., Gao, Q., 2012. Combination of Single Nucleotide Polymorphism and Variable-Number Tandem Repeats for Genotyping a Homogenous Population of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in China. *J Clin Microbiol* 50, 633–639. <https://doi.org/10.1128/JCM.05539-11>
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K., 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 178, 1274–1282.
- Marcos, L.A., Spitzer, E.D., Mahapatra, R., Ma, Y., Halse, T.A., Shea, J., Isabelle, M., Lapierre, P., Escuyer, V.E., 2017. *Mycobacterium orygis* Lymphadenitis in New York, USA. *Emerg Infect Dis* 23, 1749–1751. <https://doi.org/10.3201/eid2310.170490>
- Mardare, C., Delahay, R.J., Dale, J.W., 2013. Environmental amoebae do not support the long-term survival of virulent mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 114, 1388–1394. <https://doi.org/10.1111/jam.12166>
- Mardis, E.R., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* 24, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- Marianelli, C., Cifani, N., Capucchio, M.T., Fiasconaro, M., Russo, M., Mancusa, F.L., Pasquali, P., Marco, V.D., 2010. A Case of Generalized Bovine Tuberculosis in a Sheep: Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. <https://doi.org/10.1177/104063871002200319>
- Marin, M., Vargas, R., Harris, M., Jeffrey, B., Epperson, E., Durbin, D., Strong, M., Salfinger, M., Iqbal, Z., Akhundova, I., Vashakidze, S., Crudu, V., Rosenthal, A., Farhat, M., 2021. Genomic sequence characteristics and the empiric accuracy of short-read sequencing. <https://doi.org/10.1101/2021.04.08.438862>
- Marsot, M., Béal, M., Scoizec, A., Mathevon, Y., Durand, B., Courcoul, A., 2016. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis in French cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine* 131, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.07.006>
- Matos, A., Figueira, L., Martins, M., Pinto, M., Matos, M., Coelho, A., 2016. New insights into *Mycobacterium bovis* prevalence in wild mammals in Portugal. *Transboundary and Emerging Diseases* 63, e313–e322.
- Mba Medie, F., Ben Salah, I., Henriissat, B., Raoult, D., Drancourt, M., 2011. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Mycobacteria as Amoeba-Resistant Organisms. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020499>
- Medeiros, L., Marassi, C. d., Duarte, R. s., da Silva, M. g., Lilenbaum, W., 2012. Comparison of decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues. *Letters in Applied Microbiology* 54, 182–186. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03185.x>
- Meehan, C.J., Goig, G.A., Kohl, T.A., Verboven, L., Dippenaar, A., Ezewudo, M., Farhat, M.R., Guthrie, J.L., Laukens, K., Miotto, P., Ofori-Anyinam, B., Dreyer, V., Supply, P., Suresh, A., Utpatel, C., van Soolingen, D., Zhou, Y., Ashton, P.M., Brites, D., Cabibbe, A.M., de Jong, B.C., de Vos, M., Menardo, F., Gagneux, S., Gao, Q., Heupink, T.H., Liu, Q., Loiseau, C., Rigouts, L., Rodwell, T.C., Tagliani, E., Walker, T.M., Warren, R.M., Zhao, Y., Zignol, M., Schito, M., Gardy, J., Cirillo, D.M., Niemann, S., Comas, I., Van Rie, A., 2019. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nature Reviews Microbiology* 17, 533–545. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0214-5>
- Mendiola, M.V., Jubete, Y., de la Cruz, F., 1992. DNA sequence of IS91 and identification of the transposase gene. *J Bacteriol* 174, 1345–1351.
- Michel, A.L., Rutten, V.P.M.G., van Helden, P.D., 2013. Preface. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, i–i. <https://doi.org/10.1111/tbed.12186>
- Michelet, L., Conde, C., Branger, M., Cochard, T., Biet, F., Boschioli, M.L., 2019. Transmission Network of Deer-Borne *Mycobacterium bovis* Infection Revealed by a WGS Approach. *Microorganisms* 7, 687. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120687>
- Michelet, L., Courcoul, A., Durand, B., Boschioli, M.L., 2018. Reconstitution of *Mycobacterium bovis*' transmission chain between cattle and wild animals. *Épidémiologie et Santé Animale* 81–90.
- Michelet, L., Cruz, K. de, Phalente, Y., Karoui, C., Hénault, S., Boschioli, M.L., 2015a. *Mycobacterium microti* detection in French wildlife. *Veterinary Record* 177, 446–446. <https://doi.org/10.1136/vr.h5754>

- Michelet, L., De Cruz, K., Hénault, S., Tambosco, J., Richomme, C., Réveillaud, É., Gares, H., Moyen, J.-L., Boschioli, M.L., 2018a. *Mycobacterium bovis* Infection of Red Fox, France. *Emerg Infect Dis* 24, 1151–1153. <https://doi.org/10.3201/eid2406.180094>
- Michelet, L., de Cruz, K., Karoui, C., Tambosco, J., Moyen, J.-L., Hénault, S., Boschioli, M.L., 2018b. Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207614>
- Michelet, L., de Cruz, K., Phalente, Y., Karoui, C., Hénault, S., Beral, M., Boschioli, M.L., 2016. *Mycobacterium microti* Infection in Dairy Goats, France. *Emerg Infect Dis* 22, 569–570. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151870>
- Michelet, L., de Cruz, K., Tambosco, J., Hénault, S., Boschioli, M.L., 2020a. *Mycobacterium microti* Interferes with Bovine Tuberculosis Surveillance. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121850>
- Michelet, L., de Cruz, K., Zanella, G., Aaziz, R., Bulach, T., Karoui, C., Hénault, S., Joncour, G., Boschioli, M.L., 2015b. Infection with *Mycobacterium microti* in Animals in France. *J Clin Microbiol* 53, 981–985. <https://doi.org/10.1128/JCM.02713-14>
- Michelet, L., Durand, B., Boschioli, M.L., 2020b. Tuberculose bovine: Bilan génotypique de *M. bovis* à l'origine des foyers bovins entre 2015 et 2017 en France Métropolitaine. *Bull Epidemiol* 91, 13.
- Michelet, L., Richomme, C., Réveillaud, E., Cruz, K., Moyen, Jean-Louis, Boschioli, M.-L., 2021. *Mycobacterium microti* Infection in Red Foxes in France. *Microorganisms* 9, 1257. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061257>
- Millán, J., Jiménez, M.Á., Viota, M., Candela, M.G., Peña, L., León-Vizcaíno, L., 2008. Disseminated bovine tuberculosis in a wild red fox (*Vulpes vulpes*) in southern Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 44, 701–706.
- Millet, J., Miyagi-Shiohira, C., Yamane, N., Sola, C., Rastogi, N., 2007. Assessment of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-QUB Markers To Further Discriminate the Beijing Genotype in a Population-Based Study of the Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan. *J Clin Microbiol* 45, 3606–3615. <https://doi.org/10.1128/JCM.00348-07>
- Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G.-J., Husson, R.N., 2011. The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. *PLoS pathogens* 7, e1002182.
- Momotani, E., Ozaki, H., Hori, M., Yamamoto, S., Kuribayashi, T., Eda, S., Ikegami, M., 2012. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice. *Springerplus* 1. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-47>
- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J., 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 40, 111–124. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90050-7)
- More, S., Bøtner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Schmidt, C.G., Michel, V., Miranda, M.A., Nielsen, S.S., Raj, M., Sihvonen, L., Spooler, H., Stegeman, J.A., Thulke, H.-H., Velarde, A., Willeberg, P., Winckler, C., Baldinelli, F., Broglia, A., Beltrán-Beck, B., Kohnle, L., Bicout, D., 2017. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): bovine tuberculosis. *EFSA Journal* 15, e04959. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4959>
- Moser, I., Proding, W.M., Hotzel, H., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., Bakker, D., Gomis, D., Seidler, T., Ellenberger, C., Hetzel, U., Wuennemann, K., Moisson, P., 2008. *Mycobacterium pinnipedii*: Transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Veterinary Microbiology* 127, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.028>
- Moss, E.L., Maghini, D.G., Bhatt, A.S., 2020. Complete, closed bacterial genomes from microbiomes using nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 38, 701–707. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0422-6>
- Mostowy, S., Cousins, D., Behr, M.A., 2004. Genomic Interrogation of the Dassie Bacillus Reveals It as a Unique RD1 Mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Bacteriol* 186, 104–109. <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.104-109.2003>
- Müller, B., Hilty, M., Berg, S., Garcia-Pelayo, M.C., Dale, J., Boschioli, M.L., Cadmus, S., Ngandolo, B.N.R., Godreuil, S., Diguimbaye-Djaibé, C., Kazwala, R., Bonfoh, B., Njanpop-Lafourcade, B.M., Sahraoui, N., Guetarni, D., Aseffa, A., Mekonnen, M.H., Razanamparany, V.R., Ramarokoto, H., Djønne, B., Oloya, J., Machado, A., Mucavele, C., Skjerve, E., Portaels, F., Rigouts, L., Michel, A., Müller, A., Källenius, G., van Helden, P.D., Hewinson, R.G., Zinsstag, J., Gordon, S.V., Smith, N.H., 2009. African 1, an epidemiologically important clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon, and Chad. *J Bacteriol* 191, 1951–1960. <https://doi.org/10.1128/JB.01590-08>
- Murray, C., Ortblad, K., Guinovart, C., Lim, S., Wolock, T., Roberts, D., Dansereau, E., Graetz, N., Barber, R., Brown, J., Wang, H., Duber, H., Naghavi, M., Dicker, D., Dandona, L., Salomon, J., Heuton, K.,

- Foreman, K., Phillips, D., Vos, T., 2014. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 384, 1005–1070. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60844-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60844-8)
- Napier, G., Campino, S., Merid, Y., Abebe, M., Woldeamanuel, Y., Aseffa, A., Hibberd, M.L., Phelan, J., Clark, T.G., 2020. Robust barcoding and identification of *Mycobacterium tuberculosis* lineages for epidemiological and clinical studies. *Genome Med* 12, 114. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00817-3>
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., de la Fuente, J., 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 127, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.002>
- Nebenzahl-Guimaraes, H., Verhagen, L.M., Borgdorff, M.W., van Soolingen, D., 2015. Transmission and Progression to Disease of *Mycobacterium tuberculosis* Phylogenetic Lineages in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 53, 3264–3271. <https://doi.org/10.1128/JCM.01370-15>
- Neill, S.D., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, D.P., Pollock McA., J., Clements, A., Walton, E., Bryson, D.G., 1994. Detection of *mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Veterinary Record* 135, 134–135. <https://doi.org/10.1136/vr.135.6.134>
- Nelson, M.C., Morrison, H.G., Benjamino, J., Grim, S.L., Graf, J., 2014. Analysis, Optimization and Verification of Illumina-Generated 16S rRNA Gene Amplicon Surveys. *PLOS ONE* 9, e94249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094249>
- Ngabonziza, J.C.S., Loiseau, C., Marceau, M., Jouet, A., Menardo, F., Tzfadia, O., Antoine, R., Niyigena, E.B., Mulders, W., Fissette, K., Diels, M., Gaudin, C., Duthoy, S., Ssengooba, W., André, E., Kaswa, M.K., Habimana, Y.M., Brites, D., Affolabi, D., Mazarati, J.B., de Jong, B.C., Rigouts, L., Gagneux, S., Meehan, C.J., Supply, P., 2020. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. *Nature Communications* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16626-6>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol* 32, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Niemann, S., Richter, E., Rüscher-Gerdes, S., 2000. Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol* 38, 152–157.
- Nugent, G., 2011. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: A New Zealand case study. *Veterinary Microbiology, Special issue: 5th International Conference on Mycobacterium bovis* 151, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.023>
- Nugent, G., Buddle, B., Knowles, G., 2015. Epidemiology and control of *Mycobacterium bovis* infection in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*), the primary wildlife host of bovine tuberculosis in New Zealand. *N Z Vet J* 63, 28–41. <https://doi.org/10.1080/00480169.2014.963791>
- O'Brien, D., Schmitt, S., Fierke, J., Hogle, S., Winterstein, S., Cooley, T., Moritz, W., Diegel, K., Fitzgerald, S., Berry, D., Kaneene, J., 2002. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995–2000. *Preventive veterinary medicine* 54, 47–63. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(02\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00010-7)
- Ocepek, M., Pate, M., Žolnir-Dovč, M., Poljak, M., 2005. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. *J Clin Microbiol* 43, 3555–3557. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3555-3557.2005>
- O'Connor, C.M., Abid, M., Walsh, A.L., Behbod, B., Roberts, T., Booth, L.V., Thomas, H.L., Smith, N.H., Palkopoulou, E., Dale, J., Nunez-Garcia, J., Morgan, D., 2019. Cat-to-Human Transmission of *Mycobacterium bovis*, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 25, 2284–2286. <https://doi.org/10.3201/eid2512.190012>
- Oettinger, T., Jørgensen, M., Ladefoged, A., Hasløv, K., Andersen, P., 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and Lung Disease* 79, 243–250. <https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0206>
- Oh, E.-J., Park, Y.-J., Chang, C.L., Kim, B.K., Kim, S.M., 2001. Improved detection and differentiation of mycobacteria with combination of *Mycobacterium* Growth Indicator Tube and Roche COBAS AMPLICOR System in conjunction with Duplex PCR. *Journal of Microbiological Methods* 46, 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00254-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00254-8)
- Oh, P., Granich, R., Scott, J., Sun, B., Joseph, M., Stringfield, C., Thisdell, S., Staley, J., Workman-Malcolm, D., Borenstein, L., Lehnkering, E., Ryan, P., Soukup, J., Nitta, A., Flood, J., 2002. Human Exposure following *Mycobacterium tuberculosis* Infection of Multiple Animal Species in a Metropolitan Zoo. *Emerg Infect Dis* 8, 1290–1293. <https://doi.org/10.3201/eid0811.020302>

- O'Hagan, M.J.H., Matthews, D.I., Laird, C., McDowell, S.W.J., 2016. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis and adoption of related biosecurity measures in Northern Ireland: A case-control study. *The Veterinary Journal* 213, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.03.021>
- O'Hare, A., Balaz, D., Wright, D.M., McCormick, C., McDowell, S., Trewby, H., Skuce, R.A., Kao, R.R., 2021. A new phylodynamic model of *Mycobacterium bovis* transmission in a multi-host system uncovers the role of the unobserved reservoir. *PLoS computational biology* 17, e1009005.
- Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A.S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, B.J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O., LoBue, P., Fujiwara, P.I., 2017. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action. *The Lancet Infectious Diseases* 17, e21–e25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6)
- Olea-Popelka, F.J., Flynn, O., Costello, E., McGrath, G., Collins, J.D., O'Keeffe, J., Kelton, D.F., Berke, O., Martin, S.W., 2005. Spatial relationship between *Mycobacterium bovis* strains in cattle and badgers in four areas in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 71, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.05.008>
- Olsen, I., Boysen, P., Kulberg, S., Hope, J.C., Jungersen, G., Storset, A.K., 2005. Bovine NK Cells Can Produce Gamma Interferon in Response to the Secreted Mycobacterial Proteins ESAT-6 and MPP14 but Not in Response to MPB70. *Infect Immun* 73, 5628–5635. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5628-5635.2005>
- O'Reilly, L.M., Daborn, C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease* 76, 1–46. [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(95\)90591-X](https://doi.org/10.1016/0962-8479(95)90591-X)
- Orgeur, M., Frigui, W., Pawlik, A., Clark, S., Williams, A., Ates, L., Ma, L., Bouchier, C., Parkhill, J., Brodin, P., Brosch, R., 2021. Pathogenomic analyses of *Mycobacterium microti*, an ESX-1-deleted member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex causing disease in various hosts. *Microbial Genomics* 7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000505>
- Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T.G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A., Parkhill, J., 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Page, A.J., De Silva, N., Hunt, M., Quail, M.A., Parkhill, J., Harris, S.R., Otto, T.D., Keane, J.A., 2016. Robust high-throughput prokaryote de novo assembly and improvement pipeline for Illumina data. *Microb Genom* 2, e000083. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000083>
- Palisson, A., Courcoul, A., Durand, B., 2016. Role of Cattle Movements in Bovine Tuberculosis Spread in France between 2005 and 2014. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152578>
- Palmer, M., 2013. *Mycobacterium bovis*: Characteristics of Wildlife Reservoir Hosts. *Transboundary and Emerging Diseases* 60. <https://doi.org/10.1111/tbed.12115>
- Palmer, M.V., Thacker, T.C., 2018. Use of the Human Vaccine, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin in Deer. *Frontiers in Veterinary Science* 5.
- Palmer, M.V., Whipple, D.L., 2006. Survival of *Mycobacterium bovis* on Feedstuffs Commonly Used as Supplemental Feed for White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildl Dis* 42, 853–858. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.4.853>
- Palomino, J., Leão, S., Ritacco, V., 2022. Tuberculosis 2007; from basic science to patient care.
- Panteix, G., Gutierrez, M., Boschioli, M.-L., Rouviere, M., Plaidy, A., Pressac, D., Porcheret, H., Chyderiotis, G., Ponsada, M., Oortegem, K., Salloum, S., Cabuzel, S., Bañuls, A.-L., Van de Perre, P., Sylvain, G., 2010. Pulmonary Tuberculosis Due to *Mycobacterium microti*: A Study of Six Recent Cases in France. *Journal of medical microbiology* 59, 984–9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.019372-0>
- Parsons, S., Drewe, J., Gey van Pittius, N., Warren, R., Helden, P., 2013. Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. *Emerging infectious diseases* 19, 2004–7. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130268>
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C., Göker, M., 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol* 70, 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Pate, M., Svara, T., Gombac, M., Paller, T., Zolnir-Dovc, M., Emersic, I., Proding, W., Bartoš, M., Zdovc, I., Krt, B., Pavlik, I., Cvetnić, Z., Pogacnik, M., Ocepek, M., 2006. Outbreak of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in a Zoological Garden. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53, 387–92. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.01000.x>
- Paulson, T., 2013. Epidemiology: A mortal foe. *Nature* 502, S2–S3. <https://doi.org/10.1038/502S2a>
- Payne, A., 2014. Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de *Mycobacterium bovis* et risque de transmission entre faune sauvage et bovins: étude expérimentale en Côte d'Or.
- Payne, A., Boschioli, M.-L., Gueneau, E., Moyon, J.-L., Rambaud, T., Dufour, B., Gilot-Fromont, E., Hars, J., 2012. Bovine tuberculosis in "Eurasian" badgers (*Meles meles*) in France. *European Journal of Wildlife Research* 59, 331–339. <https://doi.org/10.1007/s10344-012-0678-3>
- Peker, N., Schuele, L., Kok, N., Terrazos, M., Neuenschwander, S.M., de Beer, J., Akkerman, O., Peter, S., Ramette, A., Merker, M., Niemann, S., Couto, N., Sinha, B., Rossen, J.W., 2021. Evaluation of whole-

- genome sequence data analysis approaches for short- and long-read sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Genom* 7, 000695. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000695>
- Perea, C., Ciaravino, G., Stuber, T., Thacker, T.C., Robbe-Austerman, S., Allepuz, A., Val, B.P. de, 2021. Whole-Genome SNP Analysis Identifies Putative *Mycobacterium bovis* Transmission Clusters in Livestock and Wildlife in Catalonia, Spain. *Microorganisms* 9, 1629. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081629>
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y., García-de-Viedma, D., 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Research in Veterinary Science, Bovine tuberculosis* 97, S94–S100. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.008>
- Pesciaroli, M., Alvarez, J., Boniotti, M.B., Cagiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pacciarini, M., Pasquali, P., 2014. Tuberculosis in domestic animal species. *Research in Veterinary Science, Bovine tuberculosis* 97, S78–S85. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.015>
- Peterhans, S., Landolt, P., Friedel, U., Oberhänsli, F., Dennler, M., Willi, B., Senn, M., Hinden, S., Kull, K., Kipar, A., Stephan, R., Ghielmetti, G., 2020. *Mycobacterium microti*: Not Just a Coincidental Pathogen for Cats. *Front Vet Sci* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.590037>
- Pfyffer, G.E., Auckenthaler, R., van Embden, J.D., van Soolingen, D., 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis* 4, 631–634.
- Philizot, S., Bénet, J., 2011. Comparative intra-dermal tuberculation. *Bulletin des GTV* 77–80.
- Pollock, J., Buddle, B., Andersen, P., 2001. Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 81, 65–9. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0273>
- Pollock, J., Girvin, R., Lightbody, K., Clements, R., Neill, S., Buddle, B., Andersen, P., 2000. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *The Veterinary record* 146, 659–65. <https://doi.org/10.1136/vr.146.23.659>
- Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *The Veterinary Journal* 163, 115–127. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0655>
- Porphyre, T., Stevenson, M., Jackson, R., McKenzie, J., 2008. Influence of contact heterogeneity on TB reproduction ratio  $R_0$  in a free-living brushtail possum *Trichosurus vulpecula* population. *Vet. Res.* 39, 1. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008007>
- Price-Carter, M., Brauning, R., de Lisle, G.W., Livingstone, P., Neill, M., Sinclair, J., Paterson, B., Atkinson, G., Knowles, G., Crews, K., Crispell, J., Kao, R., Robbe-Austerman, S., Stuber, T., Parkhill, J., Wood, J., Harris, S., Collins, D.M., 2018. Whole Genome Sequencing for Determining the Source of *Mycobacterium bovis* Infections in Livestock Herds and Wildlife in New Zealand. *Front. Vet. Sci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00272>
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., Cole, S.T., 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology* 46, 709–717. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x>
- Quinlan, A.R., Hall, I.M., 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Rahim, Z., Thapa, J., Fukushima, Y., Zanden, A.G.M. van der, Gordon, S.V., Suzuki, Y., Nakajima, C., 2017. Tuberculosis Caused by *Mycobacterium orygis* in Dairy Cattle and Captured Monkeys in Bangladesh: a New Scenario of Tuberculosis in South Asia. *Transboundary and Emerging Diseases* 64, 1965–1969. <https://doi.org/10.1111/tbed.12596>
- Ramos, D.F., Tavares, L., da Silva, P.E.A., Dellagostin, O.A., 2014. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: A review. *Braz J Microbiol* 45, 365–372.
- Ramzi, G., Medie, F., Lepidi, H., Nappez, C., Drancourt, M., 2014. Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology (Reading, England)* 160. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073379-0>
- Refrégier, G., Sola, C., Guyeux, C., 2019. Unexpected diversity of CRISPR unveils some evolutionary patterns of repeated sequences in *Mycobacterium tuberculosis*. *bioRxiv* 2019.12.13.875765. <https://doi.org/10.1101/2019.12.13.875765>
- Reis, A.C., Cunha, M.V., 2021. The open pan-genome architecture and virulence landscape of *Mycobacterium bovis*. *Microb Genom* 7, 000664. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000664>
- Remot, A., Carreras, F., Coupé, A., Doz-Deblauwe, É., Boschirola, M.L., Browne, J.A., Marquant, Q., Descamps, D., Archer, F., Aseffa, A., Germon, P., Gordon, S.V., Winter, N., 2021. Mycobacterial Infection of Precision-Cut Lung Slices Reveals Type 1 Interferon Pathway Is Locally Induced by *Mycobacterium bovis* but Not *M. tuberculosis* in a Cattle Breed. *Front Vet Sci* 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.696525>
- Renwick, A.R., White, P.C.L., Bengis, R.G., 2007. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiol Infect* 135, 529–540. <https://doi.org/10.1017/S0950268806007205>
- Rettinger, A., Broeckl, S., Fink, M., Prodinger, W.M., Blum, H., Krebs, S., Domogalla, J., Just, F., Gellert, S., Straubinger, R.K., Büttner, M., 2017. The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for

- Subtyping *Mycobacterium caprae* Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes. *Transboundary and Emerging Diseases* 64, 782–792. <https://doi.org/10.1111/tbed.12438>
- Réveillaud, É., Desvaux, S., Boschioli, M.-L., Hars, J., Faure, É., Fediaevsky, A., Cavalerie, L., Chevalier, F., Jabert, P., Poliak, S., Tourette, I., Hendriks, P., Richomme, C., 2018. Infection of Wildlife by *Mycobacterium bovis* in France Assessment Through a National Surveillance System, *Sylvatub. Front. Vet. Sci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00262>
- Reviriego Gordejo, F.J., Vermeersch, J.P., 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary microbiology*.
- Reyes, A., Sandoval, A., Cubillos-Ruiz, A., Varley, K.E., Hernández-Neuta, I., Samper, S., Martín, C., García, M., Ritacco, V., López, L., Robledo, J., Zambrano, M., Mitra, R.D., Del Portillo, P., 2012. IS-seq: a novel high throughput survey of in vivo IS6110 transposition in multiple *Mycobacterium tuberculosis* genomes. *BMC Genomics* 13, 249. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-249>
- Reyrat, J.-M., Kahn, D., 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? *Trends in Microbiology* 9, 472–473. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02168-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02168-0)
- Rhodes, S.G., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2000. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. *Immunology* 99, 195–202. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00944.x>
- Ribeiro-Lima, J., Enns, E.A., Thompson, B., Craft, M.E., Wells, S.J., 2015. From network analysis to risk analysis—An approach to risk-based surveillance for bovine tuberculosis in Minnesota, US. *Preventive Veterinary Medicine* 118, 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.12.007>
- Richomme, C., Boschioli, M.L., Hars, J., Casabianca, F., Ducrot, C., 2010. Bovine Tuberculosis in Livestock and Wild Boar on the Mediterranean Island, Corsica. *J Wildl Dis* 46, 627–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.2.627>
- Richomme, C., Réveillaud, E., Moyen, Jean-Louis, Sabatier, P., Cruz, K., Michelet, L., Boschioli, M.-L., 2020. *Mycobacterium bovis* Infection in Red Foxes in Four Animal Tuberculosis Endemic Areas in France. *Microorganisms* 8, 1070. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071070>
- Richomme, C., Rivière, J., Hars, J., Boschioli, M.-L., Gueneau, E., Fediaevsky, A., Dufour, H., 2013. Tuberculose bovine: infection de sangliers dans un parc de chasse. *Bull. Epidémiol. Santé Anim.* 56, 14–6.
- Rindi, L., Garzelli, C., 2016. Increase in non-tuberculous mycobacteria isolated from humans in Tuscany, Italy, from 2004 to 2014. *BMC Infect Dis* 16, 44. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1380-y>
- R.j, M., S.k, M., L.i, C., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species 20, 291. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1268>
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Alvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., González, S., Sáez-Llorente, J. L., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., & Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis (2010). High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary microbiology*, 141(1-2), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.007>
- Rodríguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., Juan, L. de, Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Domínguez, L., García-de-Viedma, D., Aranaz, A., 2013. Splitting of a Prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype by Variable-Number Tandem-Repeat Typing Reveals High Heterogeneity in an Evolving Clonal Group. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 3658–3665. <https://doi.org/10.1128/JCM.01271-13>
- Rodríguez-Campos, S., Schürch, A.C., Dale, J., Lohan, A.J., Cunha, M.V., Botelho, A., Cruz, K.D., Boschioli, M.L., Boniotti, M.B., Pacciarini, M., Garcia-Pelayo, M.C., Romero, B., de Juan, L., Domínguez, L., Gordon, S.V., van Soelingen, D., Loftus, B., Berg, S., Hewinson, R.G., Aranaz, A., Smith, N.H., 2012. European 2 – A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infection, Genetics and Evolution, Special Issue on Molecular evolution, epidemiology and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria* 12, 866–872. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.004>
- Rodríguez-Campos, S., Smith, N.H., Boniotti, M.B., Aranaz, A., 2014. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science, Bovine tuberculosis* 97, S5–S19. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009>
- Rojas-Espinosa, O., Løvik, M., 2001. *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* infections in domestic and wild animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 20, 219–51. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1271>
- Romero, B., Rodríguez, S., Bezos, J., Díaz, R., Copano, M.F., Merediz, I., Mínguez, O., Marqués, S., Palacios, J.J., García de Viedma, D., Sáez, J.L., Mateos, A., Aranaz, A., Domínguez, L., de Juan, L., 2011. Humans as Source of *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Cattle, Spain. *Emerg Infect Dis* 17, 2393–2395. <https://doi.org/10.3201/eid1712.101476>



- Ross, B.C., Raios, K., Jackson, K., Dwyer, B., 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 30, 942–946.
- Rossi, G., Crispell, J., Brough, T., Lycett, S.J., White, P.C., Allen, A., Ellis, R.J., Gordon, S.V., Harwood, R., Palkopoulou, E., 2022. Phylodynamic analysis of an emergent *Mycobacterium bovis* outbreak in an area with no previously known wildlife infections. *Journal of Applied Ecology* 59, 210–222.
- Rothel, J., Jones, S., Corner, L., Cox, J., Wood, P., 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67, 134–137. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1990.tb07730.x>
- Roupie, V., Alonso-Velasco, E., Van Der Heyden, S., Holbert, S., Duytschaever, L., Berthon, P., Van Dosselaer, I., Van Campe, W., Mostin, L., Biet, F., Roels, S., Huygen, K., Fretin, D., 2018. Evaluation of mycobacteria-specific gamma interferon and antibody responses before and after a single intradermal skin test in cattle naturally exposed to *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and experimentally infected with *M. bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 196, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.12.007>
- Rowe, M.T., Grant, I.R., 2006. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology* 42, 305–311. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01873.x>
- R.r, K., M, P.-C., S, R.-A., 2016. Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission 35, 241. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2430>
- Rufai, S.B., McIntosh, F., Poojary, I., Chothe, S., Sebastian, A., Albert, I., Praul, C., Venkatesan, M., Mahata, G., Maity, H., Dandapat, P., Michael, J.S., Katani, R., Kapur, V., Behr, M.A., 2021. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium orygis* Strain 51145. *Microbiol Resour Announc* 10. <https://doi.org/10.1128/MRA.01279-20>
- Ruiz, S., Strillacci, M., Duran, M., Canto, G., Herrera-Rodríguez, S., Bagnato, A., Guzman, L., Milian-Suazo, F., Roman-Ponce, S., 2019. Genome-Wide Association Study in Mexican Holstein Cattle Reveals Novel Quantitative Trait Loci Regions and Confirms Mapped Loci for Resistance to Bovine Tuberculosis. *Animals* 9, 636. <https://doi.org/10.3390/ani9090636>
- Runyon, E.H., 1965. Typical Mycobacteria: Their classification. *Am Rev Respir Dis* 91, 288–289. <https://doi.org/10.1164/arrd.1965.91.2.288>
- Ryser-Degiorgis, M.-P., 2013. Wildlife health investigations: needs, challenges and recommendations. *BMC Vet Res* 9, 223. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-223>
- Safi, H., Barnes, P.F., Lakey, D.L., Shams, H., Samten, B., Vankayalapati, R., Howard, S.T., 2004. IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 52, 999–1012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04037.x>
- Sahlin, K., Medvedev, P., 2021. Error correction enables use of Oxford Nanopore technology for reference-free transcriptome analysis. *Nat Commun* 12, 2. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20340-8>
- Salamon, H., Kato-Maeda, M., Small, P.M., Drenkow, J., Gingeras, T.R., 2000. Detection of Deleted Genomic DNA Using a Semiautomated Computational Analysis of GeneChip Data. *Genome Res* 10, 2044–2054.
- Salo, W.L., Aufderheide, A.C., Buikstra, J., Holcomb, T.A., 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 2091–2094. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2091>
- Salvador, L.C.M., O'Brien, D.J., Cosgrove, M.K., Stuber, T.P., Schooley, A.M., Crispell, J., Church, S.V., Gröhn, Y.T., Robbe-Austerman, S., Kao, R.R., 2019. Disease management at the wildlife-livestock interface: Using whole-genome sequencing to study the role of elk in *Mycobacterium bovis* transmission in Michigan, USA. *Molecular Ecology* 28, 2192–2205. <https://doi.org/10.1111/mec.15061>
- Sampson, S.L., Warren, R.M., Richardson, M., Victor, T.C., Jordaan, A.M., van der Spuy, G.D., van Helden, P.D., 2003. IS6110-Mediated Deletion Polymorphism in the Direct Repeat Region of Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 185, 2856–2866. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2856-2866.2003>
- Sanchez-Hidalgo, A., Obregón-Henao, A., Wheat, W.H., Jackson, M., Gonzalez-Juarrero, M., 2017. *Mycobacterium bovis* hosted by free-living-amoebae permits their long-term persistence survival outside of host mammalian cells and remain capable of transmitting disease to mice. *Environmental Microbiology* 19, 4010–4021. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13810>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467.
- Santos, N., Richomme, C., Nunes, T., Vicente, J., Alves, P.C., de la Fuente, J., Correia-Neves, M., Boschioli, M.-L., Delahay, R., Gortázar, C., 2020. Quantification of the Animal Tuberculosis Multi-Host Community Offers Insights for Control. *Pathogens* 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060421>
- Scanlon, M.P., Quinn, P.J., 2000. The survival of *Mycobacterium bovis* in sterilized cattle slurry and its relevance to the persistence of this pathogen in the environment. *Irish Veterinary Journal* 53, 412–415.

- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H., Palmer, M., Harris, B., Orloski, K., Buddle, B., Thacker, T., Lyashchenko, K., Waters, W., 2010. Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication. *Transboundary and emerging diseases* 57, 205–20. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x>
- Schulze-Röbbecke, R., 1993. Mycobacteria in the environment. *Immunität und Infektion* 21, 126–31.
- Schwarz, M.G.A., Antunes, D., Corrêa, P.R., Silva-Gonçalves, A.J. da, Malaga, W., Caffarena, E.R., Guilhot, C., Mendonça-Lima, L., 2021. *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG Moreau Fumarate Reductase Operons Produce Different Polypeptides That May Be Related to Non-canonical Functions. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.624121>
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sekine, Y., Izumi, K., Mizuno, T., Ohtsubo, E., 1997. Inhibition of transpositional recombination by *OrfA* and *OrfB* proteins encoded by insertion sequence IS3. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 2, 547–57. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1440342.x>
- Seva, J., Sanes, J.M., Ramis, G., Mas, A., Quereda, J.J., Villarreal-Ramos, B., Villar, D., Pallares, F.J., 2014. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 171, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.035>
- Sevilla, I.A., Arnal, M.C., Fuertes, M., Martín, E., Comenge, J., Elguezabal, N., Luco, D.F. de, Garrido, J.M., 2020. Tuberculosis outbreak caused by *Mycobacterium caprae* in a rabbit farm in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 67, 431–441. <https://doi.org/10.1111/tbed.13366>
- Sharma, A., Bloss, E., Heilig, C.M., Click, E.S., 2016. Tuberculosis Caused by *Mycobacterium africanum*, United States, 2004–2013. *Emerg Infect Dis* 22, 396–403. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151505>
- Sharma, R., Singh, P., McCoy, R.C., Lenz, S.M., Donovan, K., Ochoa, M.T., Estrada-Garcia, I., Silva-Miranda, M., Jurado-Santa Cruz, F., Balagon, M.F., Stryjewska, B., Scollard, D.M., Pena, M.T., Lahiri, R., Williams, D.L., Truman, R.W., Adams, L.B., 2019. Isolation of *Mycobacterium lepromatosis* and Development of Molecular Diagnostic Assays to Distinguish *Mycobacterium leprae* and *M. lepromatosis*. *Clin Infect Dis* 71, e262–e269. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1121>
- Shea, J., Smith, C., Halse, T.A., Kohlerschmidt, D., Rourke, A.K., Musser, K.A., Escuyer, V., Lapierre, P., 2022. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genotype Related to *M. caprae*. *Emerg Infect Dis* 28, 1431–1436. <https://doi.org/10.3201/eid2807.212353>
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G.M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J.A., Waterston, R.H., 2017. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* 550, 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>
- Shitikov, E., Guliaev, A., Bespyatykh, J., Malakhova, M., Kolchenko, S., Smirnov, G., Merker, M., Niemann, S., Mokrousov, I., Ilina, E., Govorun, V., 2019. The role of IS6110 in micro- and macroevolution of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 139, 106559. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106559>
- Silva, M.L., Cá, B., Osório, N.S., Rodrigues, P.N.S., Maceiras, A.R., Saraiva, M., 2022. Tuberculosis caused by *Mycobacterium africanum*: Knowns and unknowns. *PLOS Pathogens* 18, e1010490. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010490>
- Simpson, V., 2002. Wild Animals as Reservoirs of Infectious Diseases in the UK. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 163, 128–46. <https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0662>
- Singh, A., Gaur, M., Sharma, V., Khanna, P., Bothra, A., Bhaduri, A., Mondal, A.K., Dash, D., Singh, Y., Misra, R., 2021. Comparative Genomic Analysis of Mycobacteriaceae Reveals Horizontal Gene Transfer-Mediated Evolution of the CRISPR-Cas System in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *mSystems* 6. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00934-20>
- Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W., Branch, B., 2011. Bovine tuberculosis (TB): a review of cattle-to-cattle transmission, risk factors and susceptibility. *Bacteriology Branch Veterinary Sciences Division Agrifood and Biosciences Institute* 1, 115–167.
- Smith, N.H., 2012. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infection, Genetics and Evolution, Special Issue on Molecular evolution, epidemiology and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria* 12, 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.007>
- Smith, N.H., Berg, S., Dale, J., Allen, A., Rodriguez, S., Romero, B., Matos, F., Ghebremichael, S., Karoui, C., Donati, C., Machado, A. da C., Mucavele, C., Kazwala, R.R., Hilty, M., Cadmus, S., Ngandolo, B.N.R., Habtamu, M., Oloya, J., Muller, A., Milian-Suazo, F., Andrievskaia, O., Projahn, M., Barandiarán, S., Macías, A., Müller, B., Zanini, M.S., Ikuta, C.Y., Rodriguez, C.A.R., Pinheiro, S.R., Figueroa, A., Cho, S.-N., Mosavari, N., Chuang, P.-C., Jou, R., Zinsstag, J., van Soolingen, D., Costello, E., Aseffa, A., Proaño-Perez, F., Portaels, F., Rigouts, L., Cataldi, A.A., Collins, D.M., Boschirolì, M.L., Hewinson,

- R.G., Neto, J.S.F., Surujballi, O., Tadyon, K., Botelho, A., Zárraga, A.M., Buller, N., Skuce, R., Michel, A., Aranaz, A., Gordon, S.V., Jeon, B.-Y., Källenius, G., Niemann, S., Boniotti, M.B., van Helden, P.D., Harris, B., Zumárraga, M.J., Kremer, K., 2011. European 1: A globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 1340–1351. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.027>
- Smith, N. H., Crawshaw, T., Parry, J., Birtles, R.J., 2009. *Mycobacterium microti*: More Diverse than Previously Thought. *J Clin Microbiol* 47, 2551–2559. <https://doi.org/10.1128/JCM.00638-09>
- Smith, Noel H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R., Gordon, S.V., 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol* 7, 537–544. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2165>
- Soler-Camargo, N. C., Silva-Pereira, T. T., Zimpel, C. K., Camacho, M. F., Zelanis, A., Aono, A. H., Patané, J. S., Dos Santos, A. P., & Guimarães, A. M. S. (2022). The rate and role of pseudogenes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbial genomics*, 8(10), mgen000876. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000876>
- Soolingen, D., Hermans, P.W.M., Haas, P., Soll, D., Embden Van, J., 1991. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 29, 2578–86. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.11.2578-2586.1991>
- Soolingen, D., Hoogenboezem, T., Haas, P., Hermans, P., Koedam, M., Teppema, K., Brennan, P., Besra, G., Portaels, F., Top, J., Schouls, L., Embden Van, J., 1997. A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. *International journal of systematic bacteriology* 47, 1236–45. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1236>
- Soto, C.Y., Menendez, M.C., Perez, E., Samper, S., Gomez, A.B., Garcia, M.J., Martin, C., 2004. IS6110 Mediates Increased Transcription of the *phoP* Virulence Gene in a Multidrug-Resistant Clinical Isolate Responsible for Tuberculosis Outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 212–219. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.212-219.2004>
- Steensels, D., Fauville-Dufaux, M., Boie, J., De Beenhouwer, H., 2013. Failure of PCR-Based IS6110 Analysis To Detect Vertebral Spondylodiscitis Caused by *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 51, 366–368. <https://doi.org/10.1128/JCM.02524-12>
- Stoler, N., Nekrutenko, A., 2021. Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *NAR Genom Bioinform* 3, lqab019. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqab019>
- Streicher, E.M., Victor, T.C., van der Spuy, G., Sola, C., Rastogi, N., van Helden, P.D., Warren, R.M., 2007. Spoligotype Signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Clin Microbiol* 45, 237–240. <https://doi.org/10.1128/JCM.01429-06>
- Stucki, D., Brites, D., Jeljeli, L., Coscolla, M., Liu, Q., Trauner, A., Fenner, L., Rutaihwa, L., Borrell, S., Luo, T., Gao, Q., Kato-Maeda, M., Ballif, M., Egger, M., Macedo, R., Mardassi, H., Moreno, M., Tudo Vilanova, G., Fyfe, J., Globan, M., Thomas, J., Jamieson, F., Guthrie, J.L., Asante-Poku, A., Yeboah-Manu, D., Wampande, E., Ssenooba, W., Joloba, M., Henry Boom, W., Basu, I., Bower, J., Saraiva, M., Vaconcellos, S.E.G., Suffys, P., Koch, A., Wilkinson, R., Gail-Bekker, L., Malla, B., Ley, S.D., Beck, H.-P., de Jong, B.C., Toit, K., Sanchez-Padilla, E., Bonnet, M., Gil-Brusola, A., Frank, M., Penlap Beng, V.N., Eisenach, K., Alani, I., Wangui Ndung'u, P., Revathi, G., Gehre, F., Akter, S., Ntoumi, F., Stewart-Isherwood, L., Ntinginya, N.E., Rachow, A., Hoelscher, M., Cirillo, D.M., Skenders, G., Hoffner, S., Bakonyte, D., Stakenas, P., Diel, R., Crudu, V., Moldovan, O., Al-Hajoj, S., Otero, L., Barletta, F., Jane Carter, E., Diero, L., Supply, P., Comas, I., Niemann, S., Gagneux, S., 2016. *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet* 48, 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ng.3704>
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirola, M.L., Besnier, J.M., 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol* 47, 1249–1251. <https://doi.org/10.1128/JCM.02042-08>
- Sunnetcioglu, A., Sunnetcioglu, M., Binici, I., Baran, A.I., Karahocagil, M.K., Saydan, M.R., 2015. Comparative analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis of 411 cases. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 14, 1–5.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C., van Soolingen, D., 2006. Proposal for Standardization of Optimized *Mycobacterium tuberculosis* Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4498–4510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D., Locht, C., 2001. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on *Mycobacterial*

- Interspersed Repetitive Units. *J Clin Microbiol* 39, 3563–3571. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001>
- Supply, P., Marceau, M., Mangelot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., Majlessi, L., Criscuolo, A., Tap, J., Pawlik, A., Fiette, L., Orgeur, M., Fabre, M., Parmentier, C., Frigui, W., Simeone, R., Boritsch, E.C., Debrie, A.-S., Willery, E., Walker, D., Quail, M.A., Ma, L., Bouchier, C., Salvignol, G., Sayes, F., Cascioferro, A., Seemann, T., Barbe, V., Loch, C., Gutierrez, M.-C., Leclerc, C., Bentley, S., Stinear, T.P., Brisse, S., Médigue, C., Parkhill, J., Cruveiller, S., Brosch, R., 2013. Genome analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of the etiologic agent of tuberculosis. *Nat Genet* 45, 10.1038/ng.2517. <https://doi.org/10.1038/ng.2517>
- T, J.A.S., J, R., Rajan, A., Shankar, V., 2020. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health* 13, 1255–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>
- Tagliapietra, V., Boniotti, M.B., Mangeli, A., Karaman, I., Alborali, G., Chiari, M., D’Incau, M., Zanoni, M., Rizzoli, A., Pacciarini, M.L., 2021. *Mycobacterium microti* at the Environment and Wildlife Interface. *Microorganisms* 9, 2084. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102084>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tanner, M., Michel, A., 1999. Investigation of the viability of *M. bovis* under different environmental conditions in the Kruger National Park. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 66, 185–90.
- Tascon, R.E., Stavropoulos, E., Lukacs, K.V., Colston, M.J., 1998. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection by CD8+ T Cells Requires the Production of Gamma Interferon. *Infect Immun* 66, 830–834.
- Taylor, S., Laine, L., Leij, F., Dale, J., 2003. Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and Survival of *M. bovis* within the Amoebae. *Applied and environmental microbiology* 69, 4316–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4316-4319.2003>
- Tedersoo, L., Albertsen, M., Anslan, S., Callahan, B., 2021. Perspectives and Benefits of High-Throughput Long-Read Sequencing in Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e00626-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00626-21>
- Thabet, S., Souissi, N., 2017. Transposition mechanism, molecular characterization and evolution of IS6110, the specific evolutionary marker of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Biol Rep* 44, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4084-x>
- Thapa, J., Nakajima, C., Maharjan, B., Poudel, A., Suzuki, Y., 2015. Molecular characterization of *Mycobacterium orygis* isolates from wild animals of Nepal. *Japanese Journal of Veterinary Research* 63, 151–158. <https://doi.org/10.14943/jjvr.63.3.151>
- Thapa, J., Paudel, S., Sadaula, A., Shah, Y., Maharjan, B., Kaufman, G., McCauley, D., Gairhe, K., Tsubota, T., Suzuki, Y., Nakajima, C., 2016. *Mycobacterium orygis* –Associated Tuberculosis in Free-Ranging Rhinoceros, Nepal, 2015. *Emerging Infectious Diseases* 22. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151929>
- Thierry, D., Cave, M.D., Eisenach, K.D., Crawford, J.T., Bates, J.H., Gicquel, B., Guesdon, J.L., 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 18, 188.
- Thomas, J., Balseiro, A., Gortázar, C., Rivalde, M., 2021. Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Veterinary Research* 52. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00881-y>
- Thompson, P.J., Cousins, D.V., Gow, B.L., Collins, D.M., Williamson, B.H., Dagnia, H.T., 1993. Seals, Seal Trainers, and Mycobacterial Infection. *Am Rev Respir Dis* 147, 164–167. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.1.164>
- Thomson, R.M., Furuya-Kanamori, L., Coffey, C., Bell, S.C., Knibbs, L.D., Lau, C.L., 2020. Influence of climate variables on the rising incidence of nontuberculous mycobacterial (NTM) infections in Queensland, Australia 2001–2016. *Science of the Total Environment* 740, 139796.
- Thorel, M., 2003. Tuberculose. Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires du Bétail, Europe et Régions Chaudes 927–961.
- Thorel, M., 1982. Techniques d’isolement des mycobacteries. *Bull Lab V6t* 7, 17–24.
- Thorel, M., 1976. ACTION DE L’ACIDE SULFURIQUE A 4 P. CENT SUR LES DIVERSES ESPECES DE MYCOBACTERIES.
- Thorne, N., Borrell, S., Evans, J., Magee, J., García de Viedma, D., Bishop, C., Gonzalez-Martin, J., Gharbia, S., Arnold, C., 2011. IS6110-based global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.09.011>
- Toka, F.N., Suvas, S., Rouse, B.T., 2004. CD4+ CD25+ T Cells Regulate Vaccine-Generated Primary and Memory CD8+ T-Cell Responses against Herpes Simplex Virus Type 1. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.13082-13089.2004>
- Tonkin-Hill, G., MacAlasdair, N., Ruis, C., Weimann, A., Horesh, G., Lees, J.A., Gladstone, R.A., Lo, S., Beaudoin, C., Floto, R.A., Frost, S.D.W., Corander, J., Bentley, S.D., Parkhill, J., 2020. Producing

- polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol* 21, 180. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02090-4>
- Torres-Gonzalez, P., Soberanis-Ramos, O., Martinez-Gamboa, A., Chavez-Mazari, B., Barrios-Herrera, M.T., Torres-Rojas, M., Cruz-Hervert, L.P., Garcia-Garcia, L., Singh, M., Gonzalez-Aguirre, A., Leon-Garduño, A.P. de, Sifuentes-Osornio, J., Bobadilla-del-Valle, M., 2013. Prevalence of Latent and Active Tuberculosis among Dairy Farm Workers Exposed to Cattle Infected by *Mycobacterium bovis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2177. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002177>
- Tortoli, E., Brown-Elliott, B.A., Chalmers, J.D., Cirillo, D.M., Daley, C.L., Emler, S., Floto, R.A., Garcia, M.J., Hoefsloot, W., Koh, W.-J., Lange, C., Loebinger, M., Maurer, F.P., Morimoto, K., Niemann, S., Richter, E., Turenne, C.Y., Vasireddy, R., Vasireddy, S., Wagner, D., Wallace, R.J., Wengenack, N., van Ingen, J., 2019a. Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. *Eur Respir J* 54. <https://doi.org/10.1183/13993003.00795-2019>
- Tortoli, E., Meehan, C.J., Grottola, A., Fregni Serpini, G., Fabio, A., Trovato, A., Pecorari, M., Cirillo, D.M., 2019b. Genome-based taxonomic revision detects a number of synonymous taxa in the genus *Mycobacterium*. *Infection, Genetics and Evolution* 75, 103983. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103983>
- Trewby, H., Wright, D., Breadon, E.L., Lycett, S.J., Mallon, T.R., McCormick, C., Johnson, P., Orton, R.J., Allen, A.R., Galbraith, J., Herzyk, P., Skuce, R.A., Biek, R., Kao, R.R., 2016. Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. *Epidemics* 14, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2015.08.003>
- Tsairidou, S., Allen, A., Banos, G., Coffey, M., Anacleto, O., Byrne, A.W., Skuce, R.A., Glass, E.J., Woolliams, J.A., Doeschl-Wilson, A.B., 2018. Can we breed cattle for lower bovine TB infectivity? *Frontiers in Veterinary Science* 5, 310.
- Uren, C., Henn, B.M., Franke, A., Wittig, M., van Helden, P.D., Hoal, E.G., Möller, M., 2017. A post-GWAS analysis of predicted regulatory variants and tuberculosis susceptibility. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174738>
- van Crevel, R., Karyadi, E., Netea, M.G., Verhoef, H., Nelwan, R.H.H., West, C.E., van der Meer, J.W.M., 2002. Decreased Plasma Leptin Concentrations in Tuberculosis Patients Are Associated with Wasting and Inflammation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 758–763. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.2.8228>
- van der Zanden, A.G.M., Kremer, K., Schouls, L.M., Caimi, K., Cataldi, A., Hulleman, A., Nagelkerke, N.J.D., van Soolingen, D., 2002. Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 40, 4628–4639. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4628-4639.2002>
- van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M.J., Simeone, R., Brosch, R., van Soolingen, D., 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerg Infect Dis* 18, 653–655. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110888>
- van Pinxteren, L.A.H., Ravn, P., Agger, E.M., Pollock, J., Andersen, P., 2000. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 155–160.
- van Soolingen, D., van der Zanden, A.G.M., de Haas, P.E.W., Noordhoek, G.T., Kiers, A., Foudraïne, N.A., Portaels, F., Kolk, A.H.J., Kremer, K., van Embden, J.D.A., 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* Infections among Humans by Using Novel Genetic Markers. *J Clin Microbiol* 36, 1840–1845.
- Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M., Bozzetta, E., 2008. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 164–169.
- Vargas-Romero, F., Mendoza-Hernández, G., Suárez-Güemes, F., Hernández-Pando, R., Castañón-Arreola, M., 2016. Secretome profiling of highly virulent *Mycobacterium bovis* 04-303 strain reveals higher abundance of virulence-associated proteins. *Microbial pathogenesis* 100, 305–311.
- Vasconcellos, S.E.G., Huard, R.C., Niemann, S., Kremer, K., Santos, A.R., Suffys, P.N., Ho, J.L., 2010. Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*. *BMC Infect Dis* 10, 80. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-80>
- Vernikos, G., Medini, D., Riley, D.R., Tettelin, H., 2015. Ten years of pan-genome analyses. *Current opinion in microbiology* 23, 148–154.
- Viana, M., Mancy, R., Biek, R., Cleaveland, S., Cross, P.C., Lloyd-Smith, J.O., Haydon, D.T., 2014. Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends in ecology & evolution* 29, 270–279.
- Vicente, J., Barasona, J.A., Acevedo, P., Ruiz-Fons, J., Boadella, M., Diez-Delgado, I., Beltran-Beck, B., González-Barrio, D., Queirós, J., Montoro, V., 2013. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from Mediterranean Spain. *Transboundary and emerging diseases* 60, 92–103.

- Von Philipsborn, P., Steinbeis, F., Bender, M.E., Regmi, S., Tinnemann, P., 2015. Poverty-related and neglected diseases—an economic and epidemiological analysis of poverty relatedness and neglect in research and development. *Global health action* 8, 25818.
- Vordermeier, H.M., Jones, G.J., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., Villarreal-Ramos, B., 2016. Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annual Review of Animal Biosciences* 4, 87–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111311>
- Vultos, T.D., Mestre, O., Rauzier, J., Golec, M., Rastogi, N., Rasolofo, V., Tonjum, T., Sola, C., Matic, I., Gicquel, B., 2008. Evolution and Diversity of Clonal Bacteria: The Paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 3, e1538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001538>
- Wagner, J.C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., Levisseur, S., 1958. An Acid-fast Bacillus isolated from the Lungs of the Cape Hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 181, 284–285. <https://doi.org/10.1038/181284b0>
- Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakhikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K., Earl, A.M., 2014. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
- Walter, K.S., Colijn, C., Cohen, T., Mathema, B., Liu, Q., Bowers, J., Engelthaler, D.M., Narechania, A., Croda, J., Andrews, J.R., 2019. Genomic variant identification methods alter *Mycobacterium tuberculosis* transmission inference. *bioRxiv* 733642. <https://doi.org/10.1101/733642>
- Wang, J., Chen, K., Ren, Q., Zhang, Y., Liu, J., Wang, G., Liu, A., Li, Y., Liu, G., Luo, J., Miao, W., Xiong, J., Yin, H., Guan, G., 2021. Systematic Comparison of the Performances of *De Novo* Genome Assemblers for Oxford Nanopore Technology Reads From Piroplasm. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.696669>
- Ward, A., Judge, J., Delahay, R., 2010. Farm husbandry and badger behaviour: opportunities to manage badger to cattle transmission of *Mycobacterium bovis*? *Preventive veterinary medicine* 93, 2–10.
- Ward, S.K., Heintz, J.A., Albrecht, R.M., Talaat, A.M., 2012. Single-Cell Elemental Analysis of Bacteria: Quantitative Analysis of Polyphosphates in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00063>
- Waters, W.R., Nonnecke, B.J., Rahner, T.E., Palmer, M.V., Whipple, D.L., Horst, R.L., 2001. Modulation of *Mycobacterium bovis*-Specific Responses of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 1204–1212. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1204-1212.2001>
- Watrelot, D., Drevon Gaillot, E., Toussaint, Y., Belli, P., 2006. Comparison of Three Diagnostic Detection Methods for Tuberculosis in French Cattle. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53, 321–5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00957.x>
- Wei, W., Zhang, S., Fleming, J., Chen, Ying, Li, Z., Fan, S., Liu, Yi, Wang, W., Wang, T., Liu, Ying, Ren, B., Wang, M., Jiao, J., Chen, Yuanyuan, Zhou, Ying, Zhou, Yafeng, Gu, S., Zhang, X., Wan, L., Chen, T., Zhou, L., Chen, Yong, Zhang, X.-E., Li, C., Zhang, H., Bi, L., 2019. *Mycobacterium tuberculosis* type III-A CRISPR/Cas system crRNA and its maturation have atypical features. *The FASEB Journal* 33, 1496–1509. <https://doi.org/10.1096/fj.201800557RR>
- Wells, A.Q., 1937. Tuberculosis in Wild Voles. *Lancet*.
- Weniger, T., Krawczyk, J., Supply, P., Niemann, S., Harmsen, D., 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 38, W326–W331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq351>
- Whiley, H., Keegan, A., Giglio, S., Bentham, R., 2012. *Mycobacterium avium* complex – the role of potable water in disease transmission. *Journal of Applied Microbiology* 113, 223–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05298.x>
- Wick, R.R., Holt, K.E., 2021. Benchmarking of long-read assemblers for prokaryote whole genome sequencing. *F1000Res* 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21782.4>
- Wick, R.R., Judd, L.M., Holt, K.E., 2019. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol* 20, 129. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1727-y>
- Wingett, S.W., Andrews, S., 2018. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res* 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
- Wood, P.R., Corner, L.A., Plackett, P., 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$  interferon. *Research in Veterinary Science* 49, 46–49. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31044-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31044-0)
- Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. BOVIGAMTM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81, 147–155. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0272>
- World Health Organization, 2020. Health Topics: Zoonoses. Zoonoses: Geneva.
- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health, 2017. Roadmap for zoonotic tuberculosis. World Health Organization, Geneva.

- Wright, D., Allen, A., Mallon, T., McDowell, S., Bishop, S., Glass, E., Bermingham, M., Woolliams, J., Skuce, R., 2013. Field-Isolated Genotypes of *Mycobacterium bovis* Vary in Virulence and Influence Case Pathology but Do Not Affect Outbreak Size. *PLoS one* 8, e74503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074503>
- Yang, F., Xu, L., Liang, L., Liang, W., Li, J., Lin, D., Dai, M., Zhou, D., Li, Y., Chen, Y., Zhao, H., Tian, G., Feng, S., 2021. The Involvement of *Mycobacterium* Type III-A CRISPR-Cas System in Oxidative Stress. *Front Microbiol* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774492>
- Zanella, G., Durand, B., Hars, J., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., Duvauchelle, A., Fermé, M., Karoui, C., Boschioli, M.L., 2008. *MYCOBACTERIUM BOVIS* IN WILDLIFE IN FRANCE. *J Wildl Dis* 44, 99–108. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.1.99>
- Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: Algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>
- Zhang, J., Abadia, E., Refregier, G., Tafaj, S., Boschioli, M.L., Guillard, B., Andremont, A., Ruimy, R., Sola, C., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of ‘spoligotyping’ with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 285–294. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.016949-0>
- Zhao, Y., Jia, X., Yang, J., Ling, Y., Zhang, Z., Yu, J., Wu, J., Xiao, J., 2014. PanGP: A tool for quickly analyzing bacterial pan-genome profile. *Bioinformatics* 30, 1297–1299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu017>
- Zheng, H., Lu, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhu, G., Shi, W., Zhang, L., Wang, H., Wang, S., Zhao, G., Zhang, Y., 2008. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002375>
- Zimpel, C.K., Patané, J.S.L., Guedes, A.C.P., de Souza, R.F., Silva-Pereira, T.T., Camargo, N.C.S., de Souza Filho, A.F., Ikuta, C.Y., Neto, J.S.F., Setubal, J.C., Heinemann, M.B., Guimaraes, A.M.S., 2020. Global Distribution and Evolution of *Mycobacterium bovis* Lineages. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00843>
- Zwyer, M., Cavusoglu, C., Ghielmetti, G., Pacciarini, M., Scaltriti, E., Soolingen, D., Dötsch, A., Reinhard, M., Gagneux, S., Brites, D., 2021. A new nomenclature for the livestock-associated *Mycobacterium tuberculosis* complex based on phylogenomics. *Open Research Europe* 1, 100. <https://doi.org/10.12688/openreseurope.14029.2>

Loi n°54-1207 du 6 décembre 1954 MODIFIE ET COMPLETE LA LOI DU 7 JUILLET 1933, ARTICLES 1 (PROPHYLAXIE DE LA TUBERCULOSE), 6 (ANIMAUX VENDUS POUR BOUCHERIE) ET 8 (USAGE DES PREPARATIONS DESTINEES AU DIAGNOSTIC). 1954. Lien internet : <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000509275>.

Directive 64/432/CEE du Conseil du 26 juin 1964 relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine. 1964. Lien internet : <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000317575/>.

NF U47-109. 2004. Lien internet : <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-u47109/methodes-danalyse-en-sante-animale-isolement-et-identification-de-brucella-/fa135997/24121>.

DGAL/SDSPA/SDSSA/N2013-8123. 2013. Lien internet : <https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-N2013-8123>.

DGAL/SDSPA/2017-979. 2017. Lien internet : <https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2017-979>.

Avis de l'ANSES 2017-SA-0121. Dépistage de la tuberculose bovine par le test interféron. 2019. Lien internet : <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-lances-relatif-au-recours-au-test-de-dosage-de-linterf%C3%A9ron-gamma-pour>

Les chiffres clefs du GEB bovins. Production lait et viande. 2021. <https://www.grands-troupeaux-mag.fr/wp-content/uploads/2021/10/Chiffres-cles-bovins-2021.pdf>

Arrêté du 8 octobre 2021 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prévention, la surveillance et la police sanitaire de l'infection par le complexe *Mycobacterium tuberculosis* des animaux des espèces bovine, caprine et porcine ainsi que des élevages de camélidés et de cervidés. 2021. Lien internet : <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000044206674#:~:text=Dans%20les%20r%C3%A9sum%C3%A9s-.Arr%C3%AAt%C3%A9%20du%208%20octobre%202021%20fixant%20les%20mesures%20techniques%20et,de%20cam%C3%A9lid%C3%A9s%20et%20de%20cervid%C3%A9s.>



## 9. Annexes

Annexe 1 : Tableau présentant les informations des génomes de *Mycobacterium bovis* utilisés dans cette étude dans le panel 1. Les 87 génomes proviennent d'un travail précédent (Hauer et al., 2019). Le nom des génomes est surligné d'une couleur permettant de les distinguer à l'intérieur d'un groupe de *M. bovis* précédemment défini. En Jaune le Cluster I/Complexe clonal Eu3. En orange le Cluster G/Famille F9. En marron le Cluster C/Famille SB0134. En violet le Cluster D/Complexe clonal Eu1. En rose le Cluster A/Famille F4. En bleu le Cluster F/Complexe clonal Eu2. En gris, les autres.

<https://zenodo.org/record/7060222>

Annexe 2 : Tableau présentant les informations des génomes de *Mycobacterium bovis* utilisés dans cette étude dans le panel 3. Les 187 génomes sont de génotypes F7 et F15 (respectivement SB0821 et SB0832) qui sont deux génotypes très proches. Ces génomes avaient déjà été séquencés avant le début du travail de thèse. Certains ont été publiés avec le travail de Duault et collaborateur et d'autres ne l'ont pas encore été (noté NA) (Duault et al., 2022).

<https://zenodo.org/record/7060222>

Annexe 3 : Tableau présentant les informations des génomes de *Mycobacterium bovis* utilisés dans cette étude dans le panel 4. Les 227 génomes sont de génotypes SB0120-DHV. Ces génomes avaient déjà été séquencés avant le début du travail de thèse, mais ne sont actuellement pas publiés (noté NA dans les colonnes "Date de dépôt" et "Bio-échantillon Genbank").

<https://zenodo.org/record/7060222>

Annexe 4 : Position des sites d'insertions IS6110 dans le panel de souche de *Mycobacterium bovis* de Pyrénées-Atlantiques (SB0821 et SB0832). Position du début et de la fin de l'IS6110 sont déterminés avec l'outil ISMapper et le génome de référence AF2122/97.

<https://zenodo.org/record/7060222>

Annexe 5 : Position des sites d'insertions IS6110 dans le panel de souche de *Mycobacterium bovis* de SB0120-DHV. Position du début et de la fin de l'IS6110 sont déterminés avec l'outil ISMapper et le génome de référence Mb3601.

<https://zenodo.org/record/7060222>

Annexe 6 : Cette figure provenant du rapport de stage de Modenesi représente un arbre phylogénétique consensus circulaire de 300 souches de SB0120-DHV (Modenesi 2019). Les souches du panel 3 font parties de ces 300 souches et ont été sélectionné selon la qualité de séquençage de celle-ci ce qui explique le nombre plus petit de souches retenues (227). Cet arbre est divisé en 11 clades de couleur différente. Les valeurs de probabilité postérieures (qui correspondent à la probabilité que ces clades soient vrais) déterminées avec Beast (Drummond and Rambaut, 2007) sont représentées à l'intérieur de l'arbre.

<https://zenodo.org/record/7060222>