



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 14655

To cite this version :

Lafort, Marie-Pierre. *La paratuberculose chez les ovins : effet de la vaccination sur la réponse sérologique et l'excrétion fécale de Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (Map)*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 91 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

LA PARATUBERCULOSE CHEZ LES OVINS : EFFET DE LA VACCINATION SUR LA REPONSE SEROLOGIQUE ET L'EXCRETION FECALE DE MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS (*MAP*)

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LAFORT Marie-Pierre
Née, le 19 janvier 1989 à Moulins (03)

Directeur de thèse : M. Fabien CORBIERE

JURY

PRESIDENT :
M. Bruno MARCHOU

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Fabien CORBIERE
M. Gilles FOUCRAS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

REMERCIEMENTS

A notre Jury de thèse :

A Monsieur le Professeur Bruno MARCHOU
Professeur des Universités
Chef de Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, UFR Toulouse Purpan
Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Fabien CORBIERE,
Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des Ruminants,
Pour m'avoir proposé cette thèse et pour tout le temps consacré à ce travail,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS,
Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des Ruminants,
Pour son aide précieuse apportée dans la réalisation de cette thèse,
Pour avoir accepté de participer à notre Jury de thèse,
Sincères remerciements.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION.....	13
I. PREMIERE PARTIE : Généralités sur la paratuberculose ovine.....	15
I.1. Situation actuelle	15
I.1.1. Prévalence de la maladie	15
I.1.2. Répartition géographique de la maladie	15
I.1.3. Impact économique.....	16
I.2. Description de la maladie.....	17
I.2.1. L'agent causal.....	17
I.2.1.1. Classification et type de souches	17
I.2.1.2. Caractéristiques.....	18
I.2.1.3. Génome.....	19
I.2.1.4. Persistance de Map dans l'environnement.....	19
I.2.1.4.1. Conditions de survie.....	19
I.2.1.4.2. Mécanismes de survie	20
I.2.1.5. Résistance aux agents chimiques	21
I.2.2. Aspects cliniques et lésionnels.....	21
I.2.2.1. Phases de la maladie.....	21
I.2.2.2. Lésions macroscopiques.....	23
I.2.2.3. Histo-pathologie et lésions microscopiques.....	23
I.2.3. Epidémiologie.....	24
I.2.3.1. Sources de contamination et matières virulentes.....	24
I.2.3.2. Modes de contamination.....	25
I.2.3.2.1. Contamination de l'animal.....	25
I.2.3.2.1.1. Voie de transmission principale.....	25
I.2.3.2.1.2. Autres voies de transmission.....	25
I.2.3.2.1.3. Vecteurs mécaniques.....	26
I.2.3.2.2. Contamination du troupeau.....	26
I.2.3.3. Réceptivité des animaux et dose infectieuse.....	26
I.2.4. Pathogénie et immunité.....	28
I.3. Moyens de dépistage.....	30
I.3.1. Méthodes directes	31
I.3.1.1. La coproculture.....	31
I.3.1.1.1. Principe.....	31
I.3.1.1.2. Caractéristiques du test	32
I.3.1.1.2.1. Milieux de culture.....	32
I.3.1.1.2.2. Préparation de l'échantillon.....	33
I.3.1.1.2.3. Croissance et colonies.....	34
I.3.1.1.2.3.1. Sur milieu solide.....	34
I.3.1.1.2.3.2. Sur milieu liquide.....	34
I.3.1.1.2.4. Sensibilité et spécificité du test	34
I.3.1.2. PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) sur fèces.....	34
I.3.1.2.1. Principe	34
I.3.1.2.2. Caractéristiques du test	35
I.3.1.2.2.1. Préparation de l'échantillon.....	36
I.3.1.2.2.2. Extraction et purification de l'ADN.....	36
I.3.1.2.2.3. Amplification.....	37

I.3.1.2.2.4. Lecture et interprétation des résultats.....	37
I.3.1.2.2.5. Sensibilité et spécificité du test	38
I.3.2. Méthodes indirectes.....	39
I.3.2.1. ELISA indirect.....	40
I.3.2.1.1. Principe.....	40
I.3.2.1.2. Caractéristiques du test.....	40
I.3.2.1.2.1. Etapes des tests ELISA indirects.....	40
I.3.2.1.2.2. Sensibilité et spécificité du test	41
I.3.2.2. Comparaison des 3 méthodes (tableau 8).....	41
I.4. Méthodes de lutte contre la paratuberculose.....	42
I.4.1. Mesures sanitaires.....	42
I.4.2. La vaccination.....	43
I.4.2.1. Objectifs de la vaccination.....	43
I.4.2.2. Vaccins disponibles et leur utilisation.....	43
I.4.2.3. Limites de la vaccination et effets indésirables.....	44
I.4.2.4. Résultats de la vaccination.....	45
I.4.2.4.1. Etudes sur l'efficacité vaccinale (en général).....	45
I.4.2.4.2. Etudes chez les ovins avec le vaccin Gudair®	47
I.4.2.4.2.1. Etudes rapportées dans la méta-analyse de Bastida et Juste.....	47
I.4.2.4.2.1.1. Modalités de ces études.....	48
I.4.2.4.2.1.2. Résultats de ces études.....	48
I.4.2.4.2.1.2.1. Résultats positifs.....	48
I.4.2.4.2.1.2.2. Résultats négatifs.....	50
I.4.2.4.2.2. Etudes réalisées après 2010	51
II. DEUXIEME PARTIE : Étude expérimentale.....	52
II.1. Contexte.....	52
II.2. Objectifs de l'étude.....	53
II.3. Population d'étude	53
II.3.1. Elevages.....	53
II.3.2. Statut sérologique entre 2009 et 2012.....	54
II.3.3. Protocole de vaccination.....	55
II.3.4. Effectifs et prélèvements.....	55
II.4. Matériels et méthodes.....	57
II.4.1. Evaluation du statut sérologique : ELISA.....	57
II.4.1.1. Kit ELISA et principe	57
II.4.2. Evaluation de l'excrétion de Map dans les fèces : la qPCR	59
II.4.2.1. Kit PCR et principe	59
II.4.2.2. Quantification de l'excrétion de Map.....	62
II.5. Résultats.....	65
II.5.1. Tests ELISA.....	65
II.5.1.1. Séroprévalence et S/P moyen des brebis vaccinées.....	65
II.5.1.2. Séropositivité des brebis vaccinées par millésime.....	65
II.5.1.3. Séronégativité des brebis vaccinées par millésime.....	66
II.5.2. qPCR sur fèces.....	67
II.5.2.1. Positivité au sein des élevages et cohortes.....	67
II.5.2.2. Valeurs de Ct.....	68
II.5.2.3. Niveau d'excrétion.....	69
II.5.2.3.1. Individuel.....	69
II.5.2.3.2. Par cohorte.....	69
II.5.3. Relation entre l'excrétion et le statut sérologique	70

II.6. Discussion.....	71
II.6.1. Matériel et méthodes.....	71
II.6.1.1. Population d'étude et prélèvements.....	71
II.6.1.2. Examens de laboratoire (aspect technique).....	71
II.6.2. Résultats.....	72
II.6.2.1. Sérologie	72
II.6.2.2. qPCR sur fèces.....	74
II.6.3. Relation entre le statut sérologique et l'excrétion.....	76
CONCLUSION.....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	80
ANNEXE 1 : Plans de plaque.....	84
ANNEXE 2 : Protocole du test ELISA à partir du Kit ID Screen® Paratuberculosis Indirect.....	85
ANNEXE 3 : Protocole de la qPCR	86
ANNEXE 4 : Protocole de réalisation de la gamme de dilution.....	91

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : pourcentage de cheptels ovins connus infectés en France de 1996 à 2006 (Résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose, Le Point vétérinaire, Hervé Petit, 2006)	16
Figure 2 : relations phylogénétiques entre les différentes mycobactéries sur la base des séquences du gène ribosomal 16S (document modifié du rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, Mars 2009)	17
Figure 3 : type de souches en fonction de l'espèce (d'après Sevilla <i>et al.</i> , 2007)	18
Figure 4 : évolution des réponses immunitaires et de l'excrétion de <i>Map</i> (d'après Chiodini <i>et al.</i> , 1984)	29
Figure 5 : modèle immunopathologique de la paratuberculose (inspiré de la figure 1 du document "Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination", Bastida et Juste, 2011)	30
Figure 6 : principe de la méthode Taqman, sonde d'hydrolyse (Source : http://www.ilm.pf/PCR tempsreel)	37
Figure 7 : résultats de PCR en temps réel (Source : http://www.ilm.pf/PCR tempsreel) ...	38
Figure 8 : détection de l'infection par <i>Map</i> par différentes techniques suite à une infection expérimentale, en fonction de l'âge (d'après Kawaji <i>et al.</i> , 2011)	39
Figure 9 : représentation graphique des évaluations réalisées sur l'efficacité de la vaccination, regroupées par résultat en fonction de l'espèce animale et des effets analysés (production, épidémiologie ou pathogénicité)	46
Figure 10 : proportion d'animaux positifs au test de détection de l'IFN (%IFN positive) pour chaque ferme (property) et chaque groupe: vaccinés et témoins (vaccinated and controls)	49
Figure 11 : proportion d'animaux positifs au test ELISA (% ELISA positive) pour chaque ferme (property) et chaque groupe : vaccinés et témoins (vaccinated and controls)	49
Figure 12 : schéma de production et de croisement double étage dans le Lot	52
Figure 13 : étape de révélation stoppée par la solution d'arrêt	58
Figure 14 : étapes du test sérologique ELISA	58
Figure 15 : amplification PCR avec utilisation d'une sonde TAQMAN (d'après ADIAGENE-AES laboratoire)	61
Figure 16 : exemple de "courbe d'amplification caractéristique" avec l'obtention du Ct ...	62
Figure 17 : courbes de fluorescence de la gamme de dilution (Light Cycler 480).....	63
Figure 18 : distribution des résultats de qPCR chez les animaux positifs (Ct < 40 cycles)	68
Figure 19 : effectifs de brebis vaccinées ou non vaccinées par classe de S/P%	74
Figure 20 : plan de plaque pour les tests ELISA	84
Figure 21 : plan de plaque pour la qPCR	84

Figure 22 : mise en pot d'un échantillon de fèces	86
Figure 23 : mise en suspension d'un échantillon de fèces	86
Figure 24 : préparation des tubes à filtration	87
Figure 25 : filtration	87
Figure 26 : culot après centrifugation	87
Figure 27 : microtube	88
Figure 28 : broyeur Precellys 24	88
Figure 29 : automate KingFisher 96/Flex	89
Figure 30 : transfert des extraits d'ADN	90
Figure 31 : LightCycler 480	90

Tableaux

Tableau 1 : milieux et survie de <i>Map</i>	19
Tableau 2 : les différentes phases de la paratuberculose	22
Tableau 3 : type, forme, description et localisation des lésions de paratuberculose	24
Tableau 4 : nombre d'animaux infectés en fonction de la dose infectieuse (étude expérimentale de Delgado <i>et al.</i> , 2013)	27
Tableau 5 : nombre d'animaux euthanasiés 110-120 ou 210-220 jours post-infection et selon le niveau d'infection (HI, FI ou T) (étude expérimentale de Delgado <i>et al.</i> , 2013) ...	27
Tableau 6 : résultats positifs de la culture et de la PCR en fonction du niveau d'infection et des différents tissus utilisés (étude expérimentale de Delgado <i>et al.</i> , 2013)	28
Tableau 7 : préparation des milieux Middlebrook 7H10 et des flacons de BACTEC 12B (d'après Mercier, 2008)	32
Tableau 8 : comparaison des différents tests de dépistage (culture, PCR et ELISA)	41
Tableau 9 : caractéristiques générales des vaccins contre la paratuberculose	43
Tableau 10 : résultats de l'étude de Hilbink et West (1990)	45
Tableau 11 : réduction de l'expression clinique, de l'excrétion ou des aspects lésionnels obtenus après vaccination contre la paratuberculose (Chartier <i>et al.</i> , 2013)	47
Tableau 12 : liste des publications sur les effets du vaccin Gudair® chez les ovins et leurs caractéristiques	47
Tableau 13 : modalités des études répertoriées par Bastida et Juste (2011) sur les effets de la vaccination Gudair® chez les ovins	48
Tableau 14 : effets du vaccin Gudair® sur la clinique, l'excrétion fécale et les aspects lésionnels obtenus dans les études répertoriées par Bastida et Juste (2011) chez les ovins	48
Tableau 15 : effectifs de brebis adultes des différents élevages de l'étude en 2012	54
Tableau 16 : résultats sérologiques à la paratuberculose dans les élevages étudiés entre 2009 et 2012	54
Tableau 17 : nombre d'animaux prélevés par cohorte pour les prélèvements de sang/fèces	56

Tableau 18 : critères de validation des résultats qPCR	60
Tableau 19 : moyenne des Ct obtenus pour chaque point de la gamme (échantillons en triplicate)	63
Tableau 20 : moyenne arithmétique des Ct des gammes allant de 10 ⁴ à 10 ¹ bactéries par réaction PCR	64
Tableau 21 : séroprévalence et S/P moyen dans 5 élevages vaccinés	65
Tableau 22 : résultats de sérologie ELISA dans 5 troupeaux vaccinés, par élevage et cohorte de naissance	65
Tableau 23 : résultats de sérologie ELISA par cohorte de naissance tous élevages confondus	66
Tableau 24 : nombre et pourcentage de brebis faiblement séropositives par cohorte de naissance dans 5 troupeaux vaccinés	67
Tableau 25 : nombre et pourcentage de résultats négatifs/douteux par cohorte de naissance dans 5 troupeaux vaccinés	67
Tableau 26 : résultats positifs à la qPCR sur fèces dans les 13 élevages vaccinés	67
Tableau 27 : résultats positifs à la qPCR en fonction des millésimes de naissance	68
Tableau 28 : classification des animaux testés selon leur niveau d'excrétion (selon la classification de Crossley <i>et al.</i> , 2005)	69
Tableau 29 : niveaux d'excrétion des individus positifs	69
Tableau 30 : relation entre les résultats de qPCR et d'ELISA pour les élevages de A à E	70
Tableau 31 : relation entre l'excrétion et le S/P(%) parmi les cas positifs à la qPCR (élevages de A à E)	70
Tableau 32 : répartition des tampons dans les plaques numérotées de 1 à 5	89
Tableau 33 : programme de l'automate KingFisher 96/Flex	89

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANMV : Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
CDL : Causse Du Lot (race ovine)
CFU : Colony Formant Unit (unité anglo-saxonne)
Ct : Cycle seuil (ou « threshold Cycle »)
DNA : DeoxyriboNucleic Acid
ELISA : Absorbed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Eq : Equivalent
GDS : Groupement de Défense Sanitaire
GI : Growth index (index de croissance)
IC : Indice de Confiance
IDF : Ile De France (race ovine)
IHAP : Interaction Hôtes Agents Pathogènes
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
LB : Lymphocyte B
LT : Lymphocyte T
Map : Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis
MCL : Mycobactéries à Croissance Lente
NF : Norme Française
PCR : Polymerase Chain Reaction
RIMC : Réponse Immunitaire à Médiation Cellulaire
RIMH : Réponse Immunitaire à Médiation Humorale
Th1 : Réaction immunitaire de type 1
Th2 : Réaction immunitaire de type 2
UFC : Unité Formant Colonie (unité anglo-saxonne)
UE : Union Européenne
UMR : Université Mixte de Recherche
UV : UltraViolet

INTRODUCTION

La paratuberculose ou « maladie de Johne » est une maladie enzootique contagieuse, rencontrée chez les ruminants et due à *Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis (Map)*. Cette mycobactérie est à l'origine d'une entérite granulomateuse chronique se traduisant cliniquement par une perte de poids progressive sans perte d'appétit, accompagnée d'une baisse de production. Contrairement aux bovins, la diarrhée est un signe clinique peu fréquent chez les ovins. En raison de cette symptomatologie non spécifique et d'une période d'incubation longue (plusieurs années, à minima 1,5-2 ans), la paratuberculose est une maladie difficile à diagnostiquer. Elle ne peut être confirmée que par des examens de laboratoire ou par autopsie.

La paratuberculose est une maladie encore mal connue des éleveurs alors qu'elle est belle et bien présente en France et est à l'origine de pertes économiques non négligeables. En effet, c'est une maladie incurable qui oblige les éleveurs à réformer leurs animaux malades et qui est également responsable de baisses de production importantes. Des mesures sanitaires telles qu'un isolement des animaux malades, une bonne hygiène générale de l'élevage, une gestion du parasitisme, une alimentation suffisante en qualité et quantité (couverture des besoins énergétiques, protéiques et en minéraux, vitamines et oligoéléments) peuvent permettre de limiter l'expression clinique de la maladie. Néanmoins, ces mesures sont très souvent insuffisantes. La combinaison de ces dernières avec la vaccination pourrait s'avérer plus efficace dans la maîtrise de la maladie.

Depuis 2009, un vaccin espagnol nommé Gudair® a obtenu une Autorisation Temporaire d'Utilisation pour les petits ruminants et peut être utilisé chez les jeunes ovins après autorisation par la Direction Départementale de la Protection des Populations. Plusieurs publications ont montré une certaine efficacité de ce vaccin chez les ovins, notamment la réduction des signes cliniques et de la mortalité, la diminution du nombre d'animaux excréteurs et de la charge bactérienne excrétée et la baisse de l'intensité des lésions observées à l'abattoir. Toutefois, la vaccination ne semble pas empêcher l'infection et ne peut être envisagée sans mesures sanitaires associées.

En Midi Pyrénées, le schéma de sélection et de production en race Causse du Lot est

particulièrement propice au développement de la maladie. Désormais, dans certains élevages du Lot, des éleveurs vaccinent leurs animaux et observent des répercussions favorables en terme d'expression clinique de la maladie.

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'effet du vaccin Gudair® sur la réponse sérologique et l'excrétion fécale de *Map* dans des troupeaux infectés de race Causse du Lot. L'objectif à plus long terme est d'évaluer l'utilisation de la sérologie et de la PCR sur des prélèvements de mélange dans le suivi de ces troupeaux vaccinés afin de pouvoir émettre des recommandations concernant le maintien ou l'arrêt éventuel de la vaccination à partir des profils sérologiques et des niveaux d'excrétion observés.

La première partie de ce rapport est consacrée à une revue bibliographique rapide de la maladie, des moyens diagnostiques disponibles et des études ayant déjà évalué l'effet de la vaccination. La seconde partie présente le matériel et les méthodes adoptés dans notre étude ainsi que les principaux résultats. La dernière partie discute des intérêts et limites de notre étude.

I. PREMIERE PARTIE : Généralités sur la paratuberculose ovine

I.1. Situation actuelle

I.1.1. Prévalence de la maladie

En France, aucune étude de la prévalence n'a été conduite à l'échelle nationale chez les ovins. La seule enquête sérologique de grande ampleur chez les petits ruminants a été réalisée chez les caprins en 2010 et a montré que l'infection par *Map* était très fréquente. L'enquête a été conduite dans environ 100 troupeaux répartis dans les principales régions où l'élevage caprin est présent. La prévalence réelle des troupeaux infectés a été estimée à 63% (IC à 95 % [41-84]) tandis que la prévalence individuelle réelle a été estimée à 7% (IC à 95 % [6,1-7,0]). La prévalence intra-troupeau (calculée dans les troupeaux avec au moins un animal séro-positif) était très variable : en moyenne, elle a atteint 11,1 % (Mercier *et al.*, 2011).

En Europe, plusieurs études ont été réalisées pour évaluer la prévalence de l'infection par *Map* au sein des troupeaux bovins, caprins et ovins. Cependant, faute d'un protocole standard et de méthodes uniformisées les comparaisons sont difficiles. Nielsen et Toft (2009) ont procédé à une revue des études réalisées sur la prévalence de la paratuberculose dans les espèces de petits ruminants et ont comparé la prévalence individuelle et intra-troupeaux en Europe. Ils ont répertorié seulement 4 études portant sur la prévalence de l'infection par *Map* dans les élevages ovins et 2 études dans les élevages mixtes ovins-caprins. Pour résumer, aucune étude n'a fourni d'estimations précises et non biaisées de la prévalence de l'infection chez les petits ruminants. Toutefois, les auteurs ont estimé à partir d'études suisses et espagnoles, que plus de 20% des troupeaux de petits ruminants en Europe seraient infectés.

I.1.2. Répartition géographique de la maladie

La paratuberculose ovine existe dans le monde entier. Elle a été essentiellement décrite dans les pays où l'élevage ovin est bien développé tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande, le Canada, les Etats-unis et plusieurs pays d'Europe.

En Europe, elle est surtout connue dans la partie septentrionale du continent : Grande-Bretagne, Pays-Bas, Belgique, pays scandinaves et France. Elle ne fait pas partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire dans la plupart des pays. Ainsi, elle est très souvent sous-estimée et il est difficile de connaître son importance réelle à grande échelle.

Selon une enquête réalisée auprès des groupements de défense sanitaire de France (Hervé Petit, 2006), la paratuberculose ovine semble plus répandue au sud d'une ligne Bordeaux-Lyon. Son impact économique est marqué dans le Sud-Ouest, à fort effectif ovin. Le pourcentage de cheptels ovins connus infectés entre 1994 et 2004 pouvait dépasser 10% (figure 1).

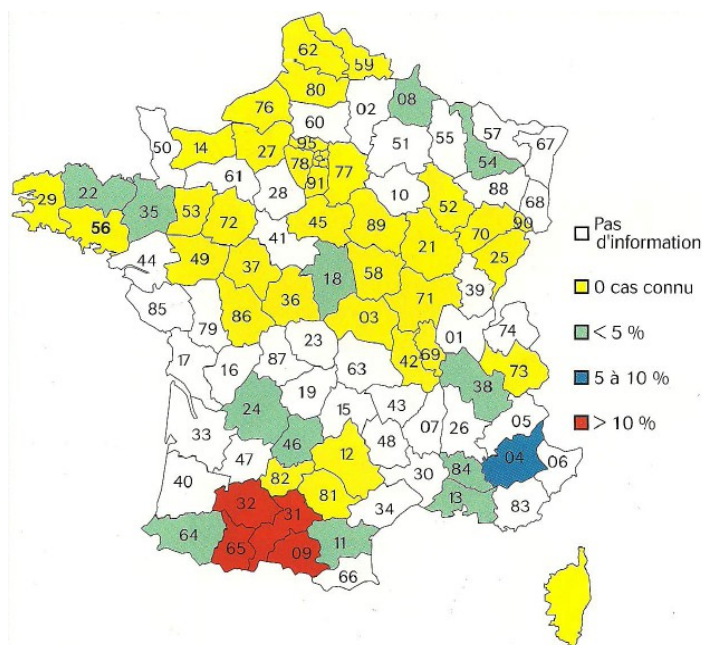


Figure 1: pourcentage de cheptels ovins connus infectés en France de 1996 à 2006 (Résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose, Le Point vétérinaire, Hervé Petit, 2006)

Selon cette même enquête, 38 départements (soit 43% de ceux ayant répondu à l'enquête) ont déclaré n'avoir aucune information sur la paratuberculose chez les ovins et les autres soulignent le fait que les informations à leur disposition sont restreintes. Ceci montre que la prévalence de l'infection est vraiment mal connue en France et qu'elle est probablement sous-estimée.

I.1.3. Impact économique

La paratuberculose ovine est une maladie dont l'impact économique est marqué. Les pertes sont essentiellement liées aux conséquences cliniques de l'infection. L'animal atteint s'amaigrit progressivement et devient, en fin d'évolution, une non-valeur économique. La maladie entraîne également une baisse de production, augmente la sensibilité à d'autres maladies, provoque souvent une infertilité et diminue l'espérance de vie. Enfin, les éleveurs sont souvent contraints à réformer précocément les animaux atteints.

D'autres frais tels que les frais de renouvellement du troupeau, les frais de dépistage et ceux

liés à d'éventuels traitements mis en place s'ajoutent au coût de la paratuberculose.

Il est difficile d'estimer les pertes économiques dues à la paratuberculose dans les élevages ovins car cet aspect est mal renseigné dans la littérature. Elles sont d'ailleurs souvent sous-estimées à cause de la méconnaissance de la maladie.

I.2. Description de la maladie

I.2.1. L'agent causal

I.2.1.1. Classification et type de souches

L'agent causal de la paratuberculose est *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*), appelé également « bacille de Johne ». Il appartient à l'ordre des Actinomycétales et à la famille des Mycobactériaceae. Le genre *Mycobacterium* comprend actuellement 72 espèces et est divisé en deux groupes principaux : les mycobactéries à croissance lente (MCL) et les mycobactéries à croissance rapide (figure 2). Les MCL sont elles-mêmes divisées en sous-groupes dont le complexe *Mycobacterium avium*. Ce sous-groupe réunit les mycobactéries atypiques dont *Map*.

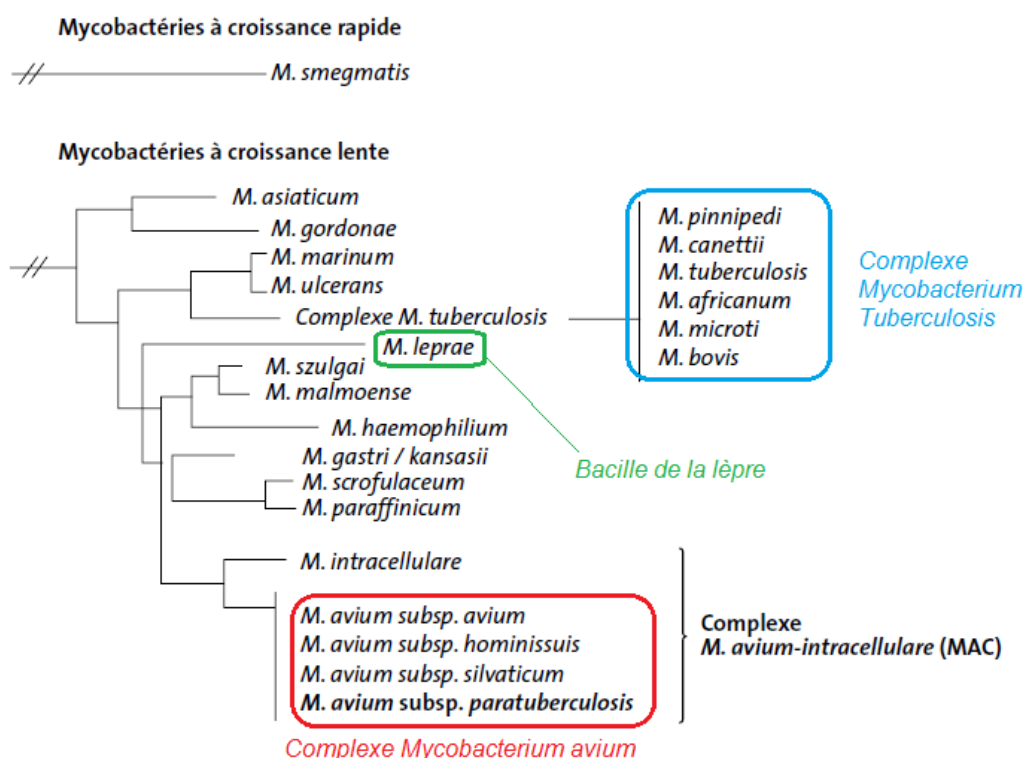


Figure 2 : relations phylogénétiques entre les différentes mycobactéries sur la base des séquences du gène ribosomal 16S (document modifié du rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, Mars 2009)

Au sein de la sous-espèce *paratuberculosis*, deux types de souches ont été identifiées (Collins *et al.*, 1990) : les souches bovines dites souches C (pour « Cattle ») et les souches ovines dites

souches S (pour « Sheep »). Ces 2 types de souches diffèrent à la fois du point de vue génotypique et phénotypique. Les souches bovines peuvent affecter toutes les espèces hôtes alors que les souches ovines sont principalement isolées chez les ovins et les caprins (figure 3). De plus, il existe différentes souches S qui se distinguent par leur profil électrophorétique (Sevilla *et al.*, 2007).

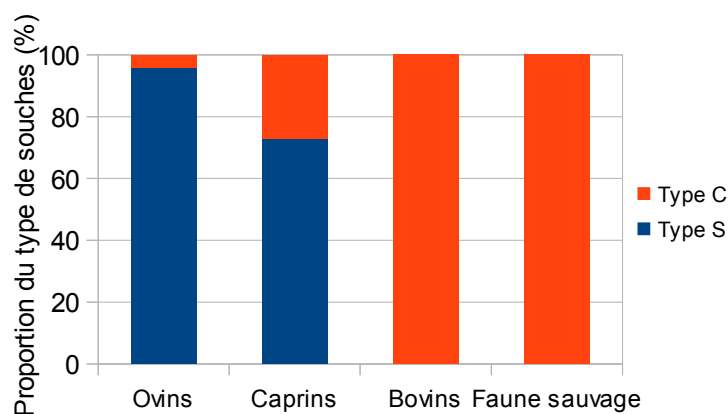


Figure 3 : type de souches en fonction de l'espèce (d'après Sevilla *et al.*, 2007)

I.2.1.2. Caractéristiques

Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont des bacilles en forme de batonnet trapu long de 1 à 2µm et large de 0,5µm, immobiles, aérobies (ou microaérophiles), non capsulés et non sporulés. Ce sont des bactéries à Gram positif difficilement identifiables par cette propriété. Ils possèdent une paroi particulière très riche en lipides qui leur confèrent une propriété commune à toutes les mycobactéries : l'acido-alcool-résistance. Cette propriété est mise en évidence par la coloration de Ziehl-Neelsen.

A la différence des autres espèces de mycobactéries, *Map* est un parasite obligatoire de l'hôte qui est strictement intracellulaire. Ceci est lié au fait qu'il est incapable de synthétiser la mycobactine, un facteur de croissance lui permettant de capter le fer et qui est nécessaire à la croissance de toutes les mycobactéries.

En outre, la culture du bacille de Johne est difficile et longue (plusieurs semaines). Il ne se multiplie pas sur les milieux classiquement utilisés pour la culture des bactéries. Sa croissance nécessite des milieux de culture spécifiques enrichis en mycobactine.

I.2.1.3. Génome

La séquence complète du génome de la souche K10 de *Map* a été décrite dans une étude de Li *et al.* (2005). Le génome de *Map* y est décrit comme étant un chromosome circulaire unique d'environ 5 millions de paires de bases, avec une teneur élevée en guanine et cytosine. Environ 1,5 % du génome est composé de motifs d'ADN répétitifs (séquences d'insertion, familles multigéniques, gènes dupliqués). Parmi les séquences d'insertion, la séquence IS900 spécifique de *Map* et comprenant 1451 paires de bases, est présente à raison de 14 à 18 copies par génome. Cette séquence est très souvent utilisée pour l'amplification génique et la détection spécifique de *Map*.

I.2.1.4. Persistance de *Map* dans l'environnement

I.2.1.4.1. Conditions de survie

Map est pourvue d'une grande résistance dans le milieu extérieur. Les études portant sur la survie de *Map* dans l'environnement sont nombreuses. Elles ont débuté avec les travaux de Lovell *et al.* (1944). Dans cette étude, des fèces de bovins contaminées par *Map* ont été placées dans diverses conditions de température, d'hygrométrie et d'éclairage. Cette étude a permis de montrer que *Map* persistait dans les fèces pendant des durées comprises entre 152 à 246 jours en fonction des conditions choisies.

Par la suite, *Map* a été isolée dans divers milieux incluant le sol, les sédiments, l'eau, le lisier et les matières fécales (tableau 1).

Tableau 1 : milieux et survie de *Map*

Milieux étudiés	Durée maximale de survie
Eau du robinet, 38°C, pH=7, obscurité (Larsen <i>et al.</i> , 1956)	17 mois post-inoculation
Eau du robinet, 38°C, pH=5 ou 8.5, obscurité (Larsen <i>et al.</i> , 1956)	14 mois post-inoculation
Lisier de porc et de bovins, à 5°C (Jorgensen 1977)	252 jours
Lisier de porc et de bovins, à 15°C (Jorgensen 1977)	98 – 152 jours
Fèces de bovins dans un champ ou parcelle sèche entièrement ombragée (Whittington <i>et al.</i> , 2004)	55 semaines
Eau et/ou sédiments de barrage mélangés dans des cuves de 250L, placés dans un endroit ombragé (Whittington <i>et al.</i> , 2005)	48 semaines
Eau et/ou sédiments de barrage mélangés dans des cuves de 250L, placés dans un endroit partiellement ombragé (Whittington <i>et al.</i> , 2005)	36 semaines
Sol et matières fécales à l'ombre (Whittington <i>et al.</i> , 2005)	12 semaines

D'après l'étude de Dhand *et al.* (2009), *Map* aurait des capacités d'attachement aux particules du sol qui seraient dépendantes du pH du sol. Une plus grande adsorption de *Map* serait observée dans les sols à pH acide.

Des données à propos des effets de la lumière naturelle sur les mycobactéries indique que la lumière solaire (et probablement les rayons UV) diminue la survie du bacille paratuberculeux mais que ce dernier serait plus résistant que *Mycobacterium bovis*. Une étude australienne plus récente (Schroen *et al.*, 2000) indique, quant à elle, que les rayons UV auraient un effet minime sur la viabilité de *Map* dans les sols contaminés.

I.2.1.4.2. Mécanismes de survie

Certaines mycobactéries sont capables de résister à la digestion intracellulaire et/ou de proliférer de manière importante dans les protozoaires. Le protozoaire aquatique du genre *Acanthamoeba* semblerait être un hôte environnemental de *Mycobacterium avium*. Effectivement, il a été démontré *in vitro* qu'une souche de référence *M. avium* avait la capacité d'entrer dans le protozoaire aquatique *Acanthamoeba castellanii* et de s'y multiplier (Cirillo *et al.*, 1997). De plus, les mécanismes permettant la résistance à la digestion par les amibes sont fréquemment similaires à ceux permettant aux micro-organismes infectieux de résister à la digestion par les macrophages ; la conséquence en est que les espèces bactériennes qui ont développé des mécanismes de résistance à la digestion par les amibes au cours de leur évolution sont aussi potentiellement pathogènes pour les organismes supérieurs, dont l'homme et les animaux. Ces similarités entre les mécanismes de virulence vis-à-vis des amibes et des eucaryotes supérieurs ont été largement démontrées pour l'espèce bactérienne *Mycobacterium avium* (Cirillo *et al.*, 1997). Autrement dit, l'ingestion de *Map* par des amibes lui apporte une protection mais peut aussi augmenter son pouvoir pathogène. Les amibes sont présents en grande quantité dans l'eau, le sol et les matières organiques. Ainsi, la survie de *Map* dans l'environnement peut être facilitée par la présence de ces protozoaires.

Whittington *et al.* (2004) ont émis l'hypothèse de l'existence d'un phénomène de dormance chez *Map*. La dormance se définit comme un état de survie des bactéries non sporulantes n'exigeant pas la réplication. Ce phénomène a été suspecté par l'observation de cultures issues du même site de prélèvement, qui étaient négatives pendant plusieurs semaines avant de devenir positives. De plus, des régions codant pour des protéines Dps (DNA-binding protein

in starved cell) impliquées dans les réponses de dormance chez d'autres mycobactéries, ont été identifiées dans le génome de *Map*. Ces protéines sont induites lorsque les cellules se retrouvent dans des conditions trophiques insuffisantes et elles confèrent donc une protection durant les stress nutritionnels et oxydatifs (Rowe et Grant, 2006).

I.2.1.5. Résistance aux agents chimiques

Map, comme la plupart des mycobactéries, est résistante aux désinfectants couramment utilisés. En revanche, elle est sensible à certains désinfectants tels que le formol à 5 %, l'eau de Javel à 10 %, le crésyl à 10 % et le sulfate de cuivre à 5 %. Une fois ingéré par des amibes, *Map* peut résister à la désinfection au chlore (Whan *et al.*, 2006).

Map est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques parmi ceux qui sont couramment utilisés. Une évaluation de l'effet *in vitro* des antibiotiques sur *Map* (pour des souches d'origine animale ou d'origine humaine), a été publiée en 2009 par Krishnan *et al.* Elle montre que les antibiotiques de la famille des macrolides (clarithromycine et l'azithromycine) sont ceux ayant la plus grande efficacité *in vitro*. La plupart des antibiotiques contre la tuberculose (éthambutol et isonizide) et contre la lèpre (dapsone et clofazimine) ne sont pas efficaces contre *Map*, la rifampicine faisant exception. Cependant, ces résultats obtenus *in vitro* ne sont pas forcément applicables à l'échelle de l'organisme.

I.2.2. Aspects cliniques et lésionnels

I.2.2.1. Phases de la maladie

Les ovins sont contaminés durant leurs premiers mois de vie. Suite à cette contamination, s'écoule une longue période d'incubation (plusieurs mois). Pendant cette période, l'animal ne présente aucune signe de la maladie et n'excrète pas de bacilles dans ses fèces. Il est qualifié d'infecté asymptomatique non excréteur.

Chez les ovins, les signes de la maladie semblent apparaître à un âge plus jeune que chez les bovins (Ayele *et al.*, 2001). Les signes subcliniques apparaissent vers l'âge d' 1,5-2 ans. Ils consistent en une diminution de la production et une plus grande sensibilité aux maladies d'élevage (mammites, boiteries, métrites). A ce stade de la maladie, certains animaux

excrètent des bactéries dans leurs fèces en quantité plus ou moins importante et de façon intermittente. La détection de ces animaux infectés asymptomatiques plus ou moins excréteurs est difficile.

Les premiers signes cliniques apparents sont intermittents et relativement discrets. Ils apparaissent après une période comprise entre 2 et 10 ans, selon la charge bactérienne lors de l'infection et l'efficacité du système immunitaire de l'individu. Les facteurs favorisant l'expression clinique sont le stress, la mise-bas, les déséquilibres alimentaires, les carences en minéraux et/ou oligo-éléments. Les animaux s'amaigrissent progressivement sans perdre l'appétit. Cette perte de poids est liée à une perte de masse grasseuse et musculaire. Une baisse de la production laitière est également observée. Contrairement aux bovins, la diarrhée n'est pas un signe clinique systématique chez les ovins. Ces derniers peuvent présenter un ramolissement des fèces qui est le plus souvent tardif et intermittent. Enfin, l'évolution de la maladie est apyrétique. Les animaux au stade clinique excrètent le plus souvent une grande quantité de bactéries dans leurs fèces. Ils sont qualifiés d'infectés symptomatiques excréteurs et sont facilement détectables au sein des troupeaux.

En phase terminale, l'animal est moribond. Il est faible, léthargique et ne produit plus de lait. Son appétit peut être malgré tout conservé.

Le tableau 2 ci-dessous résume les différentes phases de la maladie.

Tableau 2 : les différentes phases de la paratuberculose

Naissance	1,5- 2 ans	2-10 ans	
<i>Phase d'incubation</i>	<i>Phase subclinique</i>	<i>Phase clinique</i>	<i>Phase terminale</i>
Pas d'excrétion fécale Pas de signes visibles	Excrétion + Pas de signes cliniques ↓ performances	Excrétion ++ Signes cliniques Amaigrissement ↓↓ performances	Excrétion +++ Ramolissement des fèces Faiblesse généralisée

Des modifications biochimiques et hématologiques surviennent au cours de la maladie. Une anémie est observée et est caractérisée par une réduction de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine. Une hypoprotéidémie, une hypocalcémie, une hypomagnésémie et une hypokaliémie sont très souvent constatées.

I.2.2.2. Lésions macroscopiques

Les lésions se localisent principalement dans l'iléon et peuvent s'étendre au jéjunum et au caecum. Elles sont plus discrètes chez les petits ruminants que chez les bovins. Macroscopiquement, une entérite chronique hypertrophiante est observée. Cet épaissement de la paroi intestinale mène à une malabsorption des aliments et à un dépérissement progressif. Il peut y avoir une décoloration jaune ou orange diffuse des segments de l'intestin en raison de la pigmentation associée aux souches ovines de *Map* (Clarke et Little, 1996). Les noeuds lymphatiques mésentériques sont très souvent hypertrophiés et peuvent également être le siège de foyers caséux ou calcifiés.

I.2.2.3. Histo-pathologie et lésions microscopiques

De nombreuses études ont découvert l'existence de 2 types de lésions histologiques distinctes : type multibacillaire et type paucibacillaire. Ces 2 formes de lésions diffèrent par le type d'infiltrats cellulaires, le degré de colonisation mycobactérienne et la réponse immunitaire associée (Clarke et Little, 1996). La majorité des cas de paratuberculose présentent des lésions de type multibacillaire où la lésion comporte un vaste infiltrat diffus de macrophages épithélioïdes au sein de la muqueuse intestinale et de la sous-muqueuse. Les individus avec des lésions paucibacillaires présentent un infiltrat lymphocytaire dans leur intestin et des macrophages associés à des cellules géantes dans des petits granulomes. *Map* est peu voire non détectable dans les lésions paucibacillaires.

La lésion multibacillaire est souvent associée à une forte réponse immunitaire humorale et à une faible réponse immunitaire cellulaire alors que la lésion paucibacillaire génère une forte immunité à médiation cellulaire et de faibles concentrations d'anticorps. Les stades de développement et les mécanismes physiopathologiques associés de ces deux types de lésions histologiques ne sont pas bien compris (Clarke et Little, 1996).

Le système de classification de Perez *et al.* (1996) est utilisé dans de nombreuses études pour décrire les lésions histologiques de la maladie de Johne (tableau 3).

Tableau 3 : type, forme, description et localisation des lésions de paratuberculose

Type		Lésions	Localisation
Forme			
Type 1	Focale	<p>Petits granulomes formés principalement par des macrophages et souvent avec un petit nombre de lymphocytes et des cellules à noyau allongé</p> <p><i>Map</i> n'est pas visible</p>	Exclusivement situés dans le tissu lymphoïde (plaques de Peyer de l'iléon et noeuds lymphatiques mésentériques)
Type 2	Focale	<p>Granulomes bien délimités, ronds, en nombre variable (mais en nombre insuffisant pour entraîner une entérite diffuse).</p> <p><i>Map</i> parfois visible dans les granulomes de la muqueuse.</p>	Situés dans les plaques de Peyer, dans la muqueuse associée à ces plaques et dans les noeuds lymphatiques mésentériques
Type 3	3A Multifocale	<p>Granulomes multifocaux, sporadiques, de grande taille. Les villosités sont distendus, la muqueuse est épaissie.</p> <p><i>Map</i> visible dans les granulomes de la muqueuse.</p>	Situés dans les plaques de Peyer, la muqueuse intestinale associée à ces plaques, la muqueuse non associée au tissu lymphoïde, la sous-muqueuse, la séreuse et les noeuds lymphatiques mésentériques
	3B Diffuse Multibacillaire	<p>Entérite granulomateuse diffuse ; mosaïque de macrophages , de cellules épithélioïdes, de quelques cellules géantes (2-3 noyaux), d'un petit nombre de lymphocytes et autres leucocytes</p> <p><i>Map</i> présent en grande quantité (muqueuse > tissu lymphoïde)</p>	
	3C Diffuse Paucibacillaire	<p>Entérite granulomateuse diffuse ; infiltrat de cellules lymphocytaires (prédominant), macrophages associés à des cellules géantes dans des petits granulomes</p> <p><i>Map</i> rarement visible.</p>	

I.2.3. Epidémiologie

I.2.3.1. Sources de contamination et matières virulentes

Les principales sources de contamination sont les fèces des animaux infectés et excréteurs. L'excrétion de *Map* peut être précoce et survenir avant l'apparition des symptômes. Les ovins

infectés excrètent quelques bactéries par gramme de fèces au début de la phase subclinique, jusqu'à 10^4 à 10^{10} UFC/g en phase clinique. L'environnement contaminé devient alors une source majeure de contamination pour les congénères, aggravé par les capacités de résistance de *Map* dans l'environnement. Le sol, l'eau, les trayons, le matériel agricole et les aliments sont tous susceptibles d'être contaminés.

D'autres sécrétions telles que le lait, le colostrum et le sperme ont été décrites comme matières virulentes dans la transmission de la paratuberculose.

I.2.3.2. Modes de contamination

I.2.3.2.1. Contamination de l'animal

I.2.3.2.1.1. Voie de transmission principale

La transmission de la paratuberculose se fait principalement par voie oro-fécale, via l'environnement souillé par les matières fécales contaminées. La plupart des infections se produisent au tout jeune âge suivant l'ingestion du colostrum ou du lait d'une brebis infectée, ou encore d'aliments ou d'eau contaminés par des matières fécales provenant d'un animal infecté. Les jeunes agneaux peuvent aussi contracter la maladie par la têtée des mamelles contaminées par des matières fécales.

I.2.3.2.1.2. Autres voies de transmission

La transmission peut également se faire par voie respiratoire (via les aérosols contaminés), sexuelle (via le sperme contaminé) ou encore in utero (à travers la barrière placentaire) principalement lorsque la femelle exprime les signes cliniques de la maladie.

L'infection intra-utérine est bien documentée chez les bovins mais il y a très peu de données chez les ovins. Un rapport (Muhammed et Eliasson, 1979) a démontré la présence d'anticorps contre *Map* dans le sérum d'agneaux collecté directement après agnelage (avant la prise colostrale). Il semble probable que les fœtus infectés in utero pourraient développer la maladie clinique comme des adultes ou de jeunes adultes, mais ceci n'est qu'une hypothèse.

I.2.3.2.1.3. Vecteurs mécaniques

Des nématodes présents chez les ovins pourraient être en mesure d'agir comme vecteurs mécaniques de *Map* (Whittington *et al.*, 2001). Le bacille de Johne se fixerait à la surface des larves infectantes de troisième stade dans les fèces de moutons. Les larves de nématodes seraient alors un vecteur efficace dans la transmission indirecte de *Map*.

Des insectes de type diptère pourraient participer également à la transmission indirecte de *Map* entre individus (Fischer *et al.*, 2005).

Ces modalités de transmission sont cependant d'une moindre importance épidémiologique.

I.2.3.2.2. Contamination du troupeau

La paratuberculose est typiquement une maladie d'achat. L'introduction d'un animal au statut paratuberculose inconnu représente le facteur de risque le plus important.

Souvent l'animal introduit et infecté ne présente aucune signe de la maladie mais il est potentiellement excréteur ou le deviendra. Une fois dans l'élevage, ce dernier peut développer une forme clinique ou rester asymptomatique. Deux évolutions sont alors possibles. Dans le cas où l'animal devient symptomatique (suite au stress engendré par le changement d'exploitation par exemple), l'excrétion fécale du germe dans l'environnement sera importante. Ainsi, les jeunes seront rapidement contaminés et présenteront des signes cliniques plus précocément. En revanche, si l'animal reste asymptomatique, il va excréter à bas bruit le bacille dans l'environnement et la contamination des jeunes sera retardée. Les animaux seront probablement éliminés avant de démontrer les signes de la maladie.

I.2.3.3. Réceptivité des animaux et dose infectieuse

Les jeunes animaux de moins de six mois sont considérés comme les plus sensibles à l'infection. Mais l'infection des animaux adultes semblent toutefois possible.

Une étude expérimentale (Delgado *et al.*, 2013) a été menée afin d'établir l'effet de l'âge et des doses infectieuses de *Map* sur la sensibilité à la paratuberculose chez les ovins. Dans cette étude, des brebis adultes et des agneaux ont été infectés avec 2 doses infectieuses différentes et d'autres animaux ont été gardés comme témoins (tableau 4). Les animaux ont ensuite été

euthanasés à 110-120 jours post-infection et 210-220 jours post-infection (tableau 5). Des examens histologiques, des cultures et des PCR ont été réalisés sur des échantillons de tissus intestinaux (valvule iléocaecale, iléon distal) et de tissus lymphatiques (plaques de Peyer et noeuds lymphatiques mésentériques) (tableau 6).

Tableau 4 : nombre d'animaux infectés en fonction de la dose infectieuse (étude expérimentale de Delgado et al., 2013)

	Brebis adultes (2-11ans)	Agneaux (1,5 mois)
Dose infectieuse élevée (HI) (4.10⁶ UFC <i>Map</i>/ml)	13	8
Dose infectieuse faible (FI) (1.10² UFC <i>Map</i>/ml)	10	8
Témoins (T, non infectés)	7	8
Total d'animaux	30	24

* HI : Hautement infectés ; FI : Faiblement infectés ; T : Témoin

Tableau 5 : nombre d'animaux euthanasiés 110-120 ou 210-220 jours post-infection et selon le niveau d'infection (HI, FI ou T) (étude expérimentale de Delgado et al., 2013)

	Brebis adultes			Agneaux		
	HI	FI	T	HI	FI	T
Nb d'animaux euthanasiés 110-120j post-infection	6	4	2	3	3	3
Nb d'animaux euthanasiés 210-220j post-infection	7	6	5	5	5	5

* HI : Hautement infectés ; FI : Faiblement infectés ; T : Témoin

Seuls les animaux hautement infectés (92,3% des brebis et 100% des agneaux) avaient des lésions histologiques de paratuberculose. Quelques granulomes focaux délimités et situés dans le tissu lymphoïde ont été identifiés chez les adultes alors que chez les agneaux des granulomes plus nombreux et plus gros étaient présents dans la lamina propria des intestins en dehors du tissu lymphoïde.

Seuls 6 agneaux hautement infectés ont donné des cultures positives (tableau 6). Les résultats positifs en PCR ont été obtenus majoritairement chez les brebis et les agneaux hautement infectés mais certains animaux adultes ou jeunes faiblement infectés ont également donné des résultats positifs.

Tableau 6 : résultats positifs de la culture et de la PCR en fonction du niveau d'infection et des différents tissus utilisés (étude expérimentale de Delgado *et al.*, 2013)

	Agneaux HI (n=8)		Agneaux FI (n=8)		Brebis HI (n=13)		Brebis FI (n=10)	
	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR
Valvule iléo-caecale	4 (50%)	8 (100%)	0	4 (50%)	0	7 (53,9%)	0	3 (33,3%)
Iléon distal	2 (25%)	7 (87,5%)	0	1 (12,5%)	0	4 (30,8%)	0	1 (11,1%)
Jéjunum moyen - Plaque de Peyer	0	6 (75%)	0	3 (37,5%)	0	6 (46,2%)	0	2 (22,2%)
NL mésentérique	0	7 (87,5%)	0	4 (50%)	0	7 (53,9%)	0	4 (44,4%)

* HI : Hautement infectés ; FI : Faiblement infectés ; C : Culture

Les résultats de cette étude suggèrent que des brebis adultes (âgés de plus de 2 ans) peuvent être infectés par *Map*. Cependant, chez ces brebis, les lésions apparaissent presque exclusivement dans le tissu lymphoïde intestinal, sont focales et bien délimitées ; alors que chez les agneaux, elles progressent vers des formes plus avancées, se répandent dans des zones de la muqueuse indépendantes des plaques de Peyer et des noeuds lymphatiques régionaux. Enfin, seule l'inoculation orale d'une forte dose infectieuse a pu induire des lésions visibles dans les tissus chez les agneaux et les brebis. Ainsi, la dose de *Map* inoculée aux animaux dans des conditions expérimentales a une influence sur l'établissement de l'infection . Lors d'une infection naturelle, la dose infectieuse pourrait avoir la même influence.

I.2.4. Pathogénie et immunité

La mycobactérie pénètre dans l'organisme par voie orale. Elle se localise dans un premier temps aux amygdales et à l'intestin grêle. Elle franchit la muqueuse intestinale via les cellules M pour atteindre les plaques de Peyer (Momotani *et al.*, 1988). Par la suite, le bacille est pris en charge par les macrophages qui deviennent épithélioïdes une fois activé et provoquent l'activation des lymphocytes T. Deux sous-populations principales de cellules T (Th1 et Th2) sont activées par les macrophages et sont responsables des deux types de réponses immunitaires (cellulaire et humorale) à différents stades de la maladie .

Au cours des premiers stades de l'infection, une réaction immunitaire à médiation cellulaire (RIMC) se met en place. Elle permet une immunité protectrice et prévient la progression de

l'infection. La sécrétion de cytokines comme l'interféron-gamma (IFN- γ), l'interleukine-2 (IL-2) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) par les populations de lymphocytes Th1 activent les macrophages et favorisent la dégradation des bacilles dans les vésicules phagolysosomiales. A ce stade, la réponse immunitaire à médiation cellulaire peut limiter, voire éliminer, l'infection ; les animaux sont asymptomatiques et non excréteurs.

Si la réaction immunitaire cellulaire n'est pas suffisamment efficace, elle décroît progressivement au cours du temps et l'infection s'étend. *Map* se multiplie au sein de la muqueuse intestinale, entraînant son altération et l'apparition des signes cliniques. En parallèle, une réaction immunitaire à médiation humorale (RIMH) se développe progressivement. Cette dernière est stimulée par la circulation sanguine des bacilles et a une évolution dans le sens opposé à celle de la réponse cellulaire. Les lymphocytes Th2, via leur sécrétion d'IL-4, inhibent la réponse Th1 et sa production d'IFN- γ , et activent la production d'anticorps. Contrairement à la réponse cellulaire, la réponse humorale n'a pas de caractère protecteur. Au terme de la maladie, la réponse humorale peut diminuer à son tour jusqu'à l'anergie sérologique.

Au cours de l'infection, l'excrétion fécale devient de plus en plus importante. La figure 4 montre l'évolution des réponses immunitaires et celle d'excrétion fécale de *Map* au cours de l'infection.

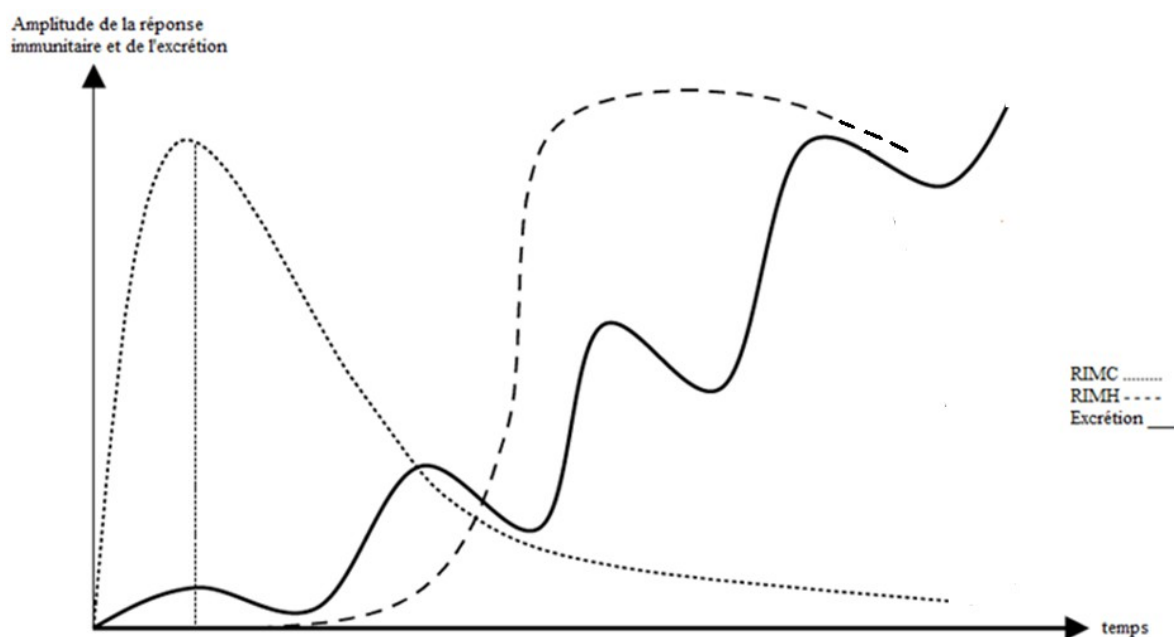


Figure 4 : évolution des réponses immunitaires et de l'excrétion de *Map* (d'après Chiodini et al., 1984)

Plusieurs formes cliniques et lésionnelles d'infection sont observées chez les ruminants. La forme présente chez un animal ne dépend pas seulement de la progression de l'infection ou du stade de la maladie ; elle dépend aussi de la résistance génétique individuelle, de la sensibilité au pathogène, de l'âge de l'individu au moment de l'infection et de l'exposition antérieure à d'autres mycobactéries.

Selon une étude (Perez *et al.*, 1999), environ 51% de moutons vivants dans un environnement contaminé ne montrent pas de signes d'infection. Ces animaux fortement exposés au bacille seraient capables de prévenir l'infection grâce à l'immunité innée ou développeraient une réponse à même d'empêcher la formation de foyers locaux d'infection. Un équilibre entre *Map* et l'hôte s'établit. Lorsque cet équilibre est rompu, différentes formes lésionnelles peuvent apparaître. Environ 24% des ovins présentent une forme focale et très délimitée. Autour de 9% des ovins ont une infection multifocale, alors qu'environ 16% des ovins présentent une forme diffuse qui conduit à l'apparition des signes cliniques et à la mort de l'animal en fin d'évolution (figure 5).

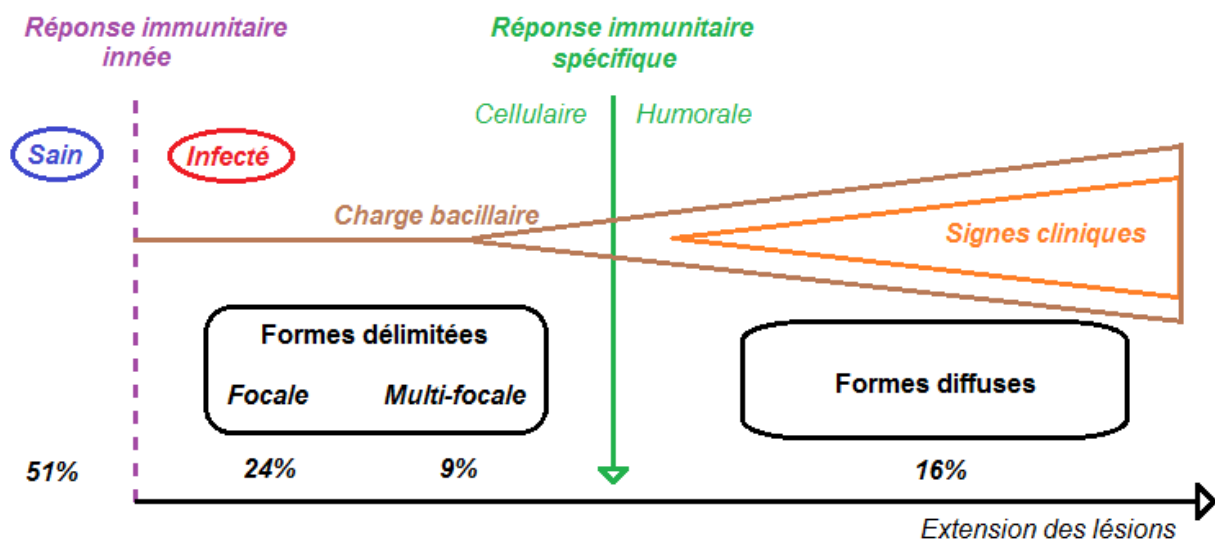


Figure 5 : modèle immunopathologique de la paratuberculose (inspiré de la figure 1 du document "Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination", Bastida et Juste, 2011)

I.3. Moyens de dépistage

Chez les petits ruminants, le diagnostic clinique est difficile à établir en raison d'une expression clinique fruste. Contrairement aux bovins où une diarrhée chronique de plus en plus marquée constitue un des éléments clés de suspicion clinique, chez les ovins un

ramollissement des fèces n'est observé que dans 20 à 60% des cas. Le diagnostic ne peut être fait qu'après réalisation d'examen de laboratoire.

En outre, la période d'incubation de la maladie est longue et varie de plusieurs semaines à plusieurs années. Pendant cette période, les animaux infectés peuvent excréter la bactérie, sans toutefois développer des signes cliniques, ce qui rend le diagnostic difficile.

De nos jours, les principales techniques de diagnostic de laboratoire de la paratuberculose sont la culture fécale, la détection du génôme bactérien par PCR (Polymerase Chain Reaction) et la sérologie en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Dans cette étude, nous décrirons ces trois techniques, les autres techniques qui ont été développées étant soit obsolètes (fixation du complément), soit de sensibilité insuffisante (coloration de Ziehl, intradermo-réaction ou test interféron-gamma).

Les tests de dépistage ou de diagnostic sont actuellement disponibles sous la forme de trousse de diagnostic qui permettent de mettre en oeuvre des protocoles normalisés au niveau international pour le diagnostic de la paratuberculose.

I.3.1. Méthodes directes

Les tests directs décrits ci-dessous permettent de détecter la bactérie ou son ADN à partir d'échantillons de fèces. La sensibilité épidémiologique de ces tests est influencée par le niveau d'excrétion fécale et le caractère intermittent de cette dernière.

I.3.1.1. La coproculture

I.3.1.1.1. Principe

La coproculture est un test classique, standardisé (NF U47-103), utilisé comme test de référence de la recherche de l'infection par *Map*. Elle permet de détecter les individus infectés excréteurs au sein d'un troupeau, qu'ils soient symptomatiques ou asymptomatiques. De plus, *Map* est parfois excrétée de façon intermittente dans les fèces, en quantité variable et hétérogène ; ces caractéristiques limitent la certitude de détection de la bactérie dans les fèces. Enfin, la coproculture nécessite un temps de culture élevé (3 à 12 semaines selon la technique de détection utilisée) et est particulièrement fastidieuse voire impossible avec certaines

souches ovines.

I.3.1.1.2. Caractéristiques du test

I.3.1.1.2.1. Milieux de culture

Les techniques de culture à partir de fèces sont nombreuses. Elles varient en fonction du milieu de culture utilisé et des protocoles de traitement qui sont mis en oeuvre avant l'ensemencement. Les souches ovines (souche S) sont plus difficiles à cultiver que les souches bovines (souche C). Elles sont notamment difficiles à cultiver sur les milieux de culture usuels tels que le milieu de Herrold. Le milieu le plus favorable à la croissance des souches ovines serait le milieu solide de Middlebrook 7H10 complété en mycobactine (Whittington *et al.*, 2011). La mycobactine peut être obtenue commercialement (mycobactine J) auprès de la Société Synbiotics, 299 avenue Jean Jaurès, 69007 Lyon, France.

En outre, il existe une technique de culture radiométrique dans laquelle la croissance de la bactérie en milieu liquide BACTEC™ 12B (Middlebrook 7H12) supplémenté avec du jaune d'oeuf et de la mycobactine, est détectée par la libération de CO₂ à partir du palmitate marqué comme conséquence du métabolisme bactérien. Cette méthode de culture est plus rapide et plus sensible que les méthodes de culture conventionnelles sur milieux solides, en ce qui concerne à la fois les souches bovines et ovines de *Map*. Cependant comme ce système est basé sur le recours à la radioactivité pour la détection, il n'est utilisable que dans certains laboratoires disposant de l'autorisation à manipuler les radionucléides (Mercier, 2008).

Les ingrédients du milieu modifié Middlebrook 7H10 et des flacons de BACTEC 12B sont donnés dans le tableau 7.

Tableau 7 : préparation des milieux Middlebrook 7H10 et des flacons de BACTEC 12B (d'après Mercier, 2008)

Milieu modifié Middlebrook 7H10	Flacons de BACTEC 12B
<ul style="list-style-type: none">- 19 g de gélose Middlebrook 7H10 (Difco), 1 g de casitone et 5 ml de glycérol sont mis en solution dans 900 ml d'eau- la solution est autoclavée à 121 °C pendant 15 min puis refroidie à 58 °C.- Les ingrédients suivants sont ajoutés de manière aseptique (le jaune d'oeuf en dernier) : 50 ml de PANTA PLUS (Becton Dickinson), 25 ml d'une solution de	<ul style="list-style-type: none">- Dans chaque flacon, les suppléments suivants sont ajoutés afin d'obtenir une concentration finale de 0,8-1 µg/ml de Mycobactin J et au moins 16 à 17 % de jaune d'oeuf dans un volume final de 5 ou 6 ml :* Pour un volume de 6 ml, ajouter 0,1 ml de Mycobactin J (50 µg/ml), 0,1 ml de PANTA PLUS, 1 ml de jaune d'oeuf et 0,8 ml d'eau.

<p>Mycobactin J (50 µg/ml), 100 ml de supplément ADC (Difco) et 250 ml de jaune d'oeuf.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le mélange est soigneusement agité par un mouvement lent de rotation et distribué à raison de 10 ml dans des tubes stériles inclinés, afin de former une pente. - Après un contrôle de stérilité, les milieux sont conservés à 4 °C. 	<p>* Pour un volume de 5 ml, ajouter 0,1 ml de Mycobactin J (50 µg/ml), 0,1 ml de PANTA PLUS et 0,8 ml de jaune d'oeuf.</p>
---	---

I.3.1.1.2.2. Préparation de l'échantillon

Les échantillons de fèces sont prélevés directement dans le rectum des animaux (environ 1 à 2 grammes). Aucun conservateur chimique n'est utilisé. Les échantillons de fèces peuvent être congelés à -70 °C.

La première étape consiste en la mise en suspension et la décontamination des fèces. Les méthodes de décontamination sont différentes selon le milieu utilisé. Pour les milieux solides du type Middlebrook, la décontamination se fait pendant 24 heures dans une solution à 0.75% de chlorure de cetylpyridinium suivi d'une sédimentation pendant 72 heures (ou centrifugation dans certains cas). Pour les milieux liquides du type BACTEC, la décontamination des échantillons est réalisée pendant 24 heures dans une solution à 1% de chlorure de cetylpyridinium, associée à une filtration avant ensemencement en présence de molécules antibiotiques (vancomycine, amphotéricine B et acide nalidixique, voire en plus triméthoprime et azlocilline).

La deuxième étape consiste en l'ensemencement des milieux de culture. Cette étape dépend également du milieu utilisé. Pour les cultures sur milieu solide, 0.1 à 0.2 mL de culot obtenu après décontamination est déposé dans les tubes contenant les milieux. Les tubes sont laissés dans une position inclinée à 37 °C pendant environ 1 semaine avec les capsules à vis desserrées. Les tubes sont remis dans une position verticale quand l'humidité des pentes s'est évaporée. Les capsules sont resserrées et les tubes sont placés dans des paniers dans une étuve à 37 °C. Pour les cultures sur milieu liquide, 0.5mL de culot sont déposés dans les flacons BACTEC.

Enfin, la troisième étape consiste en l'incubation et l'observation des cultures.

I.3.1.1.2.3. Croissance et colonies

I.3.1.1.2.3.1. Sur milieu solide

La vitesse de croissance et les isolats observés varient en fonction de l'espèce animale. Chez les ovins, les isolats se développent lentement et sont parfois pigmentés alors que les isolats bovins et caprins se développent plus rapidement.

Les colonies des souches ovines de *Map* sur milieu modifié 7H10 sont convexes, molles, humides, brillantes, de couleur allant de blanc à chamois, et très semblables à la couleur du milieu. Typiquement, la taille va de celle d'une tête d'épingle à 0.5 mm, mais peuvent atteindre 1 mm, et plus rarement 1.5 mm en cas d'un petit nombre de colonies fixé à une pente .

La lecture est faite une fois par semaine, pendant au moins 8 voire 16 semaines.

I.3.1.1.2.3.2. Sur milieu liquide

La lecture des flacons se fait par un automate qui détecte le CO₂ marqué au C¹⁴; à raison de 2 fois par semaine pendant les 2 premières semaines, puis 1 fois par semaine pour un total de 8 semaines. Un index de croissance GI > 30 est considéré comme potentiellement positif, et sera suivi par des lectures quotidiennes.

I.3.1.1.2.4. Sensibilité et spécificité du test

Dans la revue de Nielsen et Toft (2008), la sensibilité et la spécificité de la culture fécale ont été estimées chez des ovins infectés, dans une étude regroupant 368 ovins. La sensibilité était de 0,16 (IC à 95% [0,02-0,48]) et la spécificité était de 0,97 (IC à 95% [0,95-0,99]). Ainsi, la culture fécale est spécifique mais très peu sensible.

Dans notre étude, nous cherchons à identifier les animaux infectés cliniques ou sub-cliniques. Ainsi, par manque de sensibilité, la culture fécale n'est pas une méthode de dépistage appropriée.

I.3.1.2. PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) sur fèces

I.3.1.2.1. Principe

La technique basée sur l'utilisation de l'amplification génique ou PCR consiste à détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de *Map*. Il existe de nombreux protocoles de PCR permettant de mettre en évidence *Map* à partir des fèces. La majorité de ces protocoles cible la séquence d'insertion IS900 (Kim *et al.*, 2002). Cette séquence est assez spécifique de *Map* et elle est présente dans le génome de chaque cellule à hauteur de 14 à 18 exemplaires. Cependant, des séquences apparentées ont été mises en évidence chez d'autres mycobactéries. L'interprétation des résultats sur la seule base des résultats PCR ciblant l'élément d'insertion IS900 doit donc être faite avec précaution. D'autres séquences telles que F57, HspX et Ismav2 sont actuellement étudiées mais aucune étude n'a été réalisée pour évaluer la spécificité de ces séquences.

La PCR en temps réel (ou qPCR) utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

Tout comme la culture fécale, les techniques basées sur la PCR à partir des fèces permettent de détecter les animaux infectés excréteurs symptomatiques ou asymptomatiques, mais elles ne permettent pas de détecter les individus infectés non excréteurs. Elles sont aussi dépendantes des caractéristiques d'excrétion fécale de *Map* c'est-à-dire de l'intermittence de l'excrétion, de la faible quantité et de la répartition variables des bactéries dans les fèces.

L'amélioration des techniques d'extraction actuelles a permis d'éliminer la majorité des inhibiteurs de la réaction d'amplification présents dans les fèces, et des contrôles internes systématiques permettent aujourd'hui de mettre en évidence leur présence éventuelle.

I.3.1.2.2. Caractéristiques du test

La technique de la PCR comporte plusieurs étapes : la préparation de l'échantillon, l'extraction

et la purification de l'ADN, l'amplification, la lecture et l'interprétation des résultats.

I.3.1.2.2.1. Préparation de l'échantillon

Tout comme la culture fécale, les échantillons de fèces sont prélevés directement dans le rectum des animaux. Pour tous les protocoles décrits la quantité de matière fécale peut varier de 1 à 10g.

La première étape consiste en la mise en suspension des fèces. Pour cela une quantité X de fèces est pesée dans un pot de coproculture puis ajouter à de l'eau déminéralisée. Une réhydratation pendant une nuit à température ambiante est conseillée. Après mélange, la suspension est laissé au repos pour sédimenter.

I.3.1.2.2.2. Extraction et purification de l'ADN

La principale difficulté de la technique PCR est de concentrer des bactéries à partir d'échantillons qui peuvent contenir de faibles nombres de bacilles. Les protocoles décrits font appel à différentes méthodes (dilution-centrifugation, séparation à l'aide billes magnétiques, filtration, hybridation-capture, etc).

Le traitement des échantillons peut recourir ou non à l'utilisation d'un filtre afin de clarifier et de concentrer l'échantillon préalablement préparé. Cette étape de filtration permet d'augmenter la sensibilité et la reproductibilité. L'échantillon est ensuite broyé à l'aide de microbilles de broyage. Une ribolyse des échantillons avant l'étape d'extraction de l'ADN permet d'améliorer le rendement de l'extraction. Celle-ci consiste à incuber l'échantillon avec une protéinase K. Enfin l'extraction de l'ADN est réalisée par un automate.

I.3.1.2.2.3. Amplification

Pour chaque échantillon, l'extrait d'ADN est ajouté à un mélange réactionnel contenant l'ADN à amplifier, les désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates (dNTPs), les amorces, l'enzyme polymérase et la sonde.

L'amplification se déroule en plusieurs étapes (figure 6). La première étape consiste en la dénaturation des molécules d'ADN de l'échantillon. Puis la seconde étape consiste en l'hybridation entre l'amorce, la sonde et les séquences cibles. Enfin, la dernière étape consiste en l'élongation des brins d'ADN grâce à l'ADN polymérase et les dNTPs.

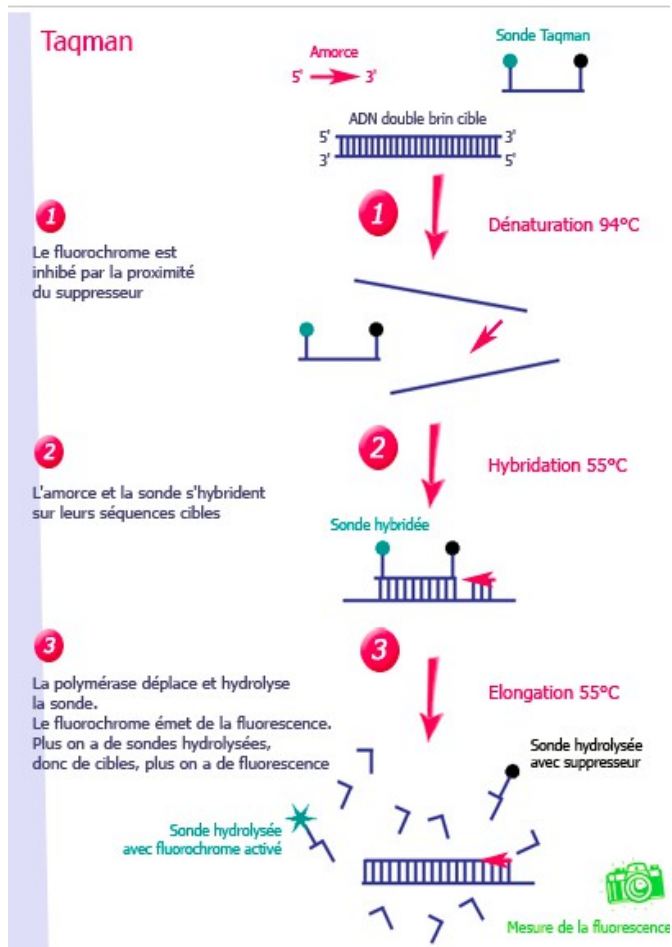


Figure 6 : principe de la méthode Taqman, sonde d'hydrolyse (Source :<http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>)

Les protocoles de qPCR sont préférentiellement associés à l'utilisation d'une sonde d'hydrolyse (type Taqman par exemple). Cette sonde est marquée à son extrémité 5' par un fluorochrome émetteur dit reporter (exemple, FAM ou VIC) et à son extrémité 3' par un fluorochrome receveur, dit quencher. Le second inhibe l'émission du premier lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation.

I.3.1.2.2.4. Lecture et interprétation des résultats

Afin de déterminer la positivité d'une PCR et/ou de quantifier un échantillon par PCR en temps réel, un nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable est déterminé. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) est

dépendant de la quantité d'ADN cible initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR. Le résultat d'une PCR en temps réel est représenté graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes (figure 7).

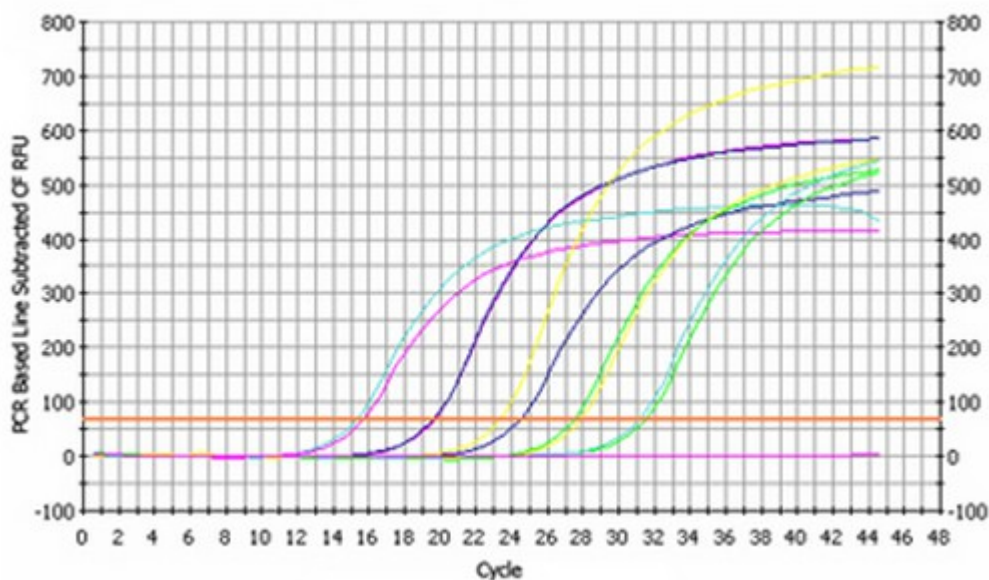


Figure 7 : résultats de PCR en temps réel (Source :<http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>)

Chaque courbe correspond à un échantillon. Elle représente la mesure de la fluorescence de cet échantillon pour chaque cycle. Le signal seuil calculé automatiquement est matérialisé sur le graphe par une ligne horizontale.

I.3.1.2.2.5. Sensibilité et spécificité du test

Kawaji *et al.* (2011) ont mené une étude longitudinale pour évaluer le potentiel de diagnostic d'une qPCR dans la détection de *Map* chez des ovins infectés. 38 moutons ont été infectés par voie orale et 20 autres moutons ont été gardés comme témoins. Tous les animaux ont été testés par qPCR et culture fécale : avant inoculation, à 4, 8 et 13 mois après inoculation. Tous les animaux ont été euthanasiés et autopsiés à 13 mois post-inoculation.

Les résultats synthétisés dans la figure 8, indiquent que 18 des 38 ovins inoculés (soit 47,4%) ont été détectés par qPCR comme étant excréteurs de *Map* dans leur fèces à 4 mois post-inoculation, tandis que seulement une brebis était positive à la culture fécale à ce moment là. A 8 mois post-inoculation, l'ADN de *Map* a été détectée par qPCR dans les fèces de tous les

ovins infectés, alors qu'elle a été isolée par culture fécale chez seulement 34,2% des ovins inoculés et que les tests sérologiques étaient positifs chez seulement 18,9% des individus infectés.

A 13 mois post-inoculation la qPCR à partir de fèces a détecté 86,4% des individus inoculés, contre 68,4% avec la qPCR à partir des tissus, 44,1% par sérologie et 43,2% par culture fécale. Aucun des échantillons recueillis avant inoculation ou recueillis sur les animaux du groupe contrôle à tout temps d'échantillonnage étaient positifs pour l'un des tests.

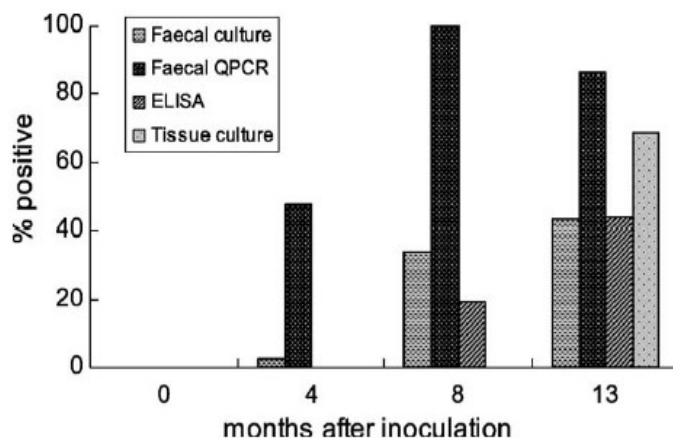


Figure 8 : détection de l'infection par *Map* par différentes techniques suite à une infection expérimentale, en fonction de l'âge (d'après Kawaji et al., 2011)

L'essai a démontré que la qPCR avait une sensibilité significativement plus élevée pour la détection de *Map* dans les matières fécales de moutons inoculés par rapport à la culture fécale.

I.3.2. Méthodes indirectes

Ces méthodes sont basées sur les réactions immunitaires de l'hôte infectée. Comme vu précédemment, celles-ci sont de deux types : réponse immunitaire cellulaire et réponse immunitaire humorale. Pour rappel, la réponse immunitaire à médiation cellulaire débute dès le début de l'infection lors de la phase asymptomatique. Puis cette dernière s'effondre progressivement tandis que la réponse immunitaire humorale se met en place (figure 4).

Certains tests tels que l'intradermo-réaction ou le test à l'interféron gamma vont permettre de mettre en évidence la réponse immune cellulaire. Ces tests permettent de détecter les animaux infectés en phase sub-clinique avant même qu'ils ne soient excréteurs. Le test cutané

intradermique réalisé est l'intradermotuberculation comparative. Elle repose sur la comparaison de l'intensité de réactions obtenues avec la tuberculine aviaire et la tuberculine bovine, administrées simultanément par voie intradermique en deux points distincts. Le test à l'interféron gamma détermine quant à lui l'amplitude de la réponse cellulaire, en quantifiant l'interféron gamma produit par les lymphocytes activés.

La spécificité de ces tests est médiocre du fait de l'absence d'un antigène spécifique de *Map*. Ainsi de nombreux faux positifs sont détectés par ces tests. Les faux positifs peuvent être la conséquence de détection d'animaux ayant été en contact avec des mycobactéries environnementales mais qui ne sont pas infectés par *Map*.

La mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale est faite par des tests sérologiques. Plusieurs tests sont aujourd'hui disponibles : les tests ELISA indirects, l'immunodiffusion en gélose ou le test de fixation du complément. La méthode ELISA apparaît plus sensible que les deux autres tests. Seule cette dernière est décrite dans les paragraphes suivants.

I.3.2.1. ELISA indirect

I.3.2.1.1. Principe

Le test consiste à détecter la réponse immune humorale induite par *Map* dans l'organisme infecté. Il met en évidence les anticorps dirigés contre *Map* dans les sérums des ovins testés.

La réponse immune humorale apparaît le plus souvent concomitamment à l'excrétion fécale et au début des signes cliniques. Ainsi, la sérologie ELISA permet de détecter les individus infectés très souvent excréteurs et symptomatiques. C'est un test de dépistage plutôt tardif.

I.3.2.1.2. Caractéristiques du test

Plusieurs trousse commerciales d'ELISA indirect sont disponibles en France et dans le monde. Elles reposent sur l'utilisation de divers antigènes de *Map* (fractions protoplasmiques, protéine recombinante...).

I.3.2.1.2.1. Etapes des tests ELISA indirects

Quelle que soit la trousse utilisée, les échantillons de sérums sont préalablement incubés dans

une solution tampon contenant une suspension de *Mycobacterium phlei* ; ceci permet d'éliminer la plupart des anticorps non spécifiques dirigés contre d'autres mycobactéries et d'autres bactéries proches au plan phylogénétique. Grâce à cette étape, la spécificité du test est améliorée car elle diminue le risque de faux positifs par réaction croisée.

Chaque trousse comporte des microplaques sensibilisées avec de l'extrait purifié de *Map*. Si dans l'échantillon testé, des anticorps anti-*Map* sont présents il y aura formation d'un complexe antigène-anticorps avec les épitopes *Map*. Un conjugué marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les cupules. Il se fixe aux anticorps anti-*Map*, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-HRP. Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB). La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester : en présence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage ; en l'absence d'anticorps, il n'apparaît pas de coloration. La lecture est réalisée à 450nm et/ou 650nm.

I.3.2.1.2.2. Sensibilité et spécificité du test

Dans l'étude de Nielsen et Toft (2008), la sensibilité du test dépend certes des caractéristiques techniques de la trousse, mais surtout du statut clinique de l'animal. La sensibilité du test pour la détection des animaux affectés (c'est-à-dire exprimant des signes cliniques évocateurs de la paratuberculose) varie de 0,36 à 0,85 en fonction de la trousse et de l'antigène utilisés, alors que la sensibilité du test à détecter des animaux infectés (individus chez lesquels *Map* est présent dans les tissus et certaines cellules, présentant ou non des signes cliniques, excréant ou non *Map*) varie de 0,16 à 0,44. Pour les deux types de statuts (affectés ou infectés), la spécificité variaient de 0,95 à 0,99 en fonction de la trousse et de l'antigène utilisés.

I.3.2.2. Comparaison des 3 méthodes (tableau 8)

Tableau 8 : comparaison des différents tests de dépistage (culture, PCR et ELISA)

	Culture	PCR	Sérologie ELISA
Dépistage des animaux infectés non excréteurs (stade précoce)	Non	Non	+/-

Dépistage des animaux infectés excréteurs asymptomatiques	++/+++ (sensibilité 10 ² germes/g)	++/+++ (sensibilité ~ ou > culture)	0/++
Suspicion clinique	Oui	Oui	Oui
Spécificité	+++	+++	+++
Influence de la vaccination	Oui (Potentielle réduction du niveau d'excrétion)	Oui (Potentielle réduction du niveau d'excrétion)	Oui
Coût moyen en France	+++ (≈ 14 euros/ animal)	+++ (≈ 25 euros/ animal)	+ (≈ 6 euros/ animal)
Temps de réalisation	3-12 semaines (selon la méthode utilisée)	48h	48h
Possibilité de réalisation sur mélange	Oui	Aucune donnée validée	Aucune donnée validée
Standardisation de la méthode ou des réactifs en France	Oui (méthode) Norme NF U47-103	Non	Non
Contexte habituel d'utilisation	Dépistage	Dépistage ou diagnostic pour confirmation de culture ou coloration Ziehl non confluente	Dépistage ou diagnostic en association avec test direct

I.4. Méthodes de lutte contre la paratuberculose

I.4.1. Mesures sanitaires

La paratuberculose ovine est une maladie difficilement curable car les molécules actives sont réservées au traitement de la tuberculose chez l'homme et pour cette raison ne sont pas autorisées chez l'animal. En revanche, des mesures sanitaires peuvent être mises en place. La séparation des jeunes animaux de leur mère permet notamment de diminuer le risque de contamination. Le dépistage et l'élimination des animaux cliniquement atteints et excréteurs ainsi que la gestion des effluents solides et liquides permet de diminuer la pression d'infection. Cependant, ces mesures ne sont pas toujours réalisables. Par exemple, dans les systèmes d'élevage allaitant (bovin ou ovin), il est impossible de séparer les jeunes de leurs mères. En outre, dans les troupeaux ovins, le dépistage individuel des animaux infectés au sein des troupeaux ovins coûte cher en raison de la taille des effectifs souvent élevée.

Il apparaît que la combinaison des mesures sanitaires citées précédemment avec la vaccination serait la meilleure solution pour contrôler la paratuberculose au sein des élevages ovins.

I.4.2. La vaccination

I.4.2.1. Objectifs de la vaccination

L'objectif principal de la vaccination est de contrôler la paratuberculose au sein des élevages. La vaccination vise à réduire le nombre d'individus infectés et surtout les conséquences cliniques associées à cette infection. De plus, elle a pour objectif de diminuer l'excrétion fécale de la bactérie, de réduire la contamination de l'environnement et la transmission aux animaux non infectés.

I.4.2.2. Vaccins disponibles et leur utilisation

Plusieurs vaccins ont vu le jour depuis 1926. En France, le seul vaccin à avoir obtenu une AMM était un vaccin vivant (Neoparasec®). Il n'est plus commercialisé depuis 2001. De nos jours, seuls 3 vaccins inactivés sont commercialisés dans le monde (tableau 9). Seul le vaccin Gudair® commercialisé en Espagne est actuellement disponible pour les ovins. Depuis 2009, l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) autorise l'importation de ce vaccin, à condition que les vétérinaires sanitaires en fassent la demande écrite et que celle-ci soit autorisée par l'ANMV. Pour obtenir l'autorisation, il est nécessaire de prouver l'existence de la paratuberculose par des analyses de laboratoire dans les cheptels souhaitant utiliser le vaccin. L'utilisation de ce vaccin provenant d'un état membre de l'UE respecte la cascade prescription hors AMM.

Tableau 9 : caractéristiques générales des vaccins contre la paratuberculose

Nom déposé	Mycopar®	Gudair®	Silirum®
Laboratoire producteur Pays	Solvay Animal Health Etats-unis	CZ Vétérinaria SA Espagne	CZ Vétérinaria SA Espagne
Nature du vaccin	Inactivé	Inactivé	Inactivé
Souches vaccinales	<i>M.avium avium St 18</i>	<i>M.avium paratuberculosis 316F</i>	<i>M.avium paratuberculosis 316F</i>
Nature de l'adjuvant	Huile minérale	Huile minérale	Huile minérale
Espèces de destination	Bovins	Ovins, Caprins	Bovins

Posologie	0,5 ml	1 ml	1 ml
Année de début d'utilisation	1972	1994	2014

Ces 3 vaccins sont composés de bactéries tuées par la chaleur, adjuvés notamment par des huiles minérales en émulsion.

Le vaccin Gudair® contient la souche inactivée 316F de *Mycobacterium avium paratuberculosis* et est combiné avec une nouvelle génération d'adjuvant. Il permet une immunisation active des ovins et caprins afin de prévenir et réduire les signes cliniques, les lésions et la mortalité dues à la paratuberculose. Il réduit également l'excrétion fécale de *Map* chez les animaux vaccinés. Les animaux peuvent être vaccinés à partir de 2 à 3 semaines d'âge, à la dose d'1 mL en injection sous cutanée.

I.4.2.3. Limites de la vaccination et effets indésirables

La vaccination n'empêche pas l'infection, tout comme elle ne prévient pas totalement l'apparition de la maladie. Dans plusieurs études portant sur l'efficacité vaccinale, des animaux vaccinés fortement excréteurs ont été mis en évidence (Munoz et al., 2005 ; Reddacliff et al., 2006). Ainsi, les animaux vaccinés doivent toujours être considérés comme des sources potentielles de contamination, même si le risque qu'ils représentent est significativement plus réduit par rapport à des animaux de statut inconnu (AFSAA, 2009).

Lors du dépistage des animaux infectés, les tests sérologiques ne permettraient pas de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. En effet, la vaccination engendre une forte réponse humorale pouvant être confondue avec celle d'un animal infecté. Dans la littérature, il y a peu d'informations à ce sujet chez les ovins. Les résultats (tableau 10) de l'étude d'Hilbink et West (1990) indiquent que la vaccination (Neoparasec®) est susceptible de provoquer une réponse positive durable au test de fixation du complément et au test de diffusion en gélose. La réponse positive au test de fixation du complément est forte quel que soit le délai entre la vaccination et le test, alors qu'elle est plutôt hétérogène pour le test de diffusion en gélose. Ainsi la vaccination peut interférer avec les tests sérologiques de diagnostic de la paratuberculose.

Tableau 10 : résultats de l'étude de Hilbink et West (1990)

Elevage	Age de vaccination	Période entre la vaccination et le test	% positifs au test *			
			Vaccinés **		Non-vaccinés **	
			Diffusion en gélose	Fixation du complément	Diffusion en gélose	Fixation du complément
1	3-4 mois	17 mois	20	100	0	0
2	3-4 mois	16,5 mois	32	64	12	20
3	3-4 semaines	6 mois	32	88	0	15
4	3-4 semaines	31 mois	84	92	NT	NT
5	3-4 mois	16 mois	57	93	0	0

* Positif au test de fixation du complément : > 50% de fixation à la dilution 1:5 du sérum

* Positif au test de diffusion sur gélose : toute ligne survenant dans les 48 heures

** 25 – 30 vaccinés et non vaccinés ont été testés dans chaque élevage NT : Non testés

Cette interférence vaccination/dépistage de la paratuberculose sera un point sur lequel portera notre étude.

Les animaux vaccinés peuvent réagir positivement à l'intradermo-réaction à la tuberculine bovine. Toutefois, la réaction à la tuberculine aviaire est plus intense que celle à la tuberculine bovine chez les animaux infectés par *Map*. Ainsi, le recours à l'intradermo-tuberculation comparative peut permettre de différencier un animal vacciné contre la paratuberculose et un animal tuberculeux. Cette problématique touche les bovins et les caprins, mais non les ovins.

Enfin, il faut noter qu'il n'est pas rare d'observer une inflammation locale au site d'injection du vaccin, en particulier avec les vaccins contenant des adjuvants huileux. Cette inflammation évolue en nodule sous-cutané fibreux persistant. Chez les petits ruminants, ce nodule peut parfois s'abcéder. Eppleston et Windsor (2007) ont réalisé une étude dont l'objectif était de déterminer la prévalence des lésions au point d'injection du vaccin Gudair® et l'impact économique de ces lésions à l'abattoir. La prévalence des lésions observées était de 18% pour les adultes et 65% pour les agneaux. Le parage réalisé pour retirer les lésions était négligeable, le surcoût du travail de retrait était nul et aucune carcasse n'a été rétrogradée à une note de valeur inférieure. Les effets collatéraux sur la valeur marchande des carcasses due à la vaccination sont donc absents.

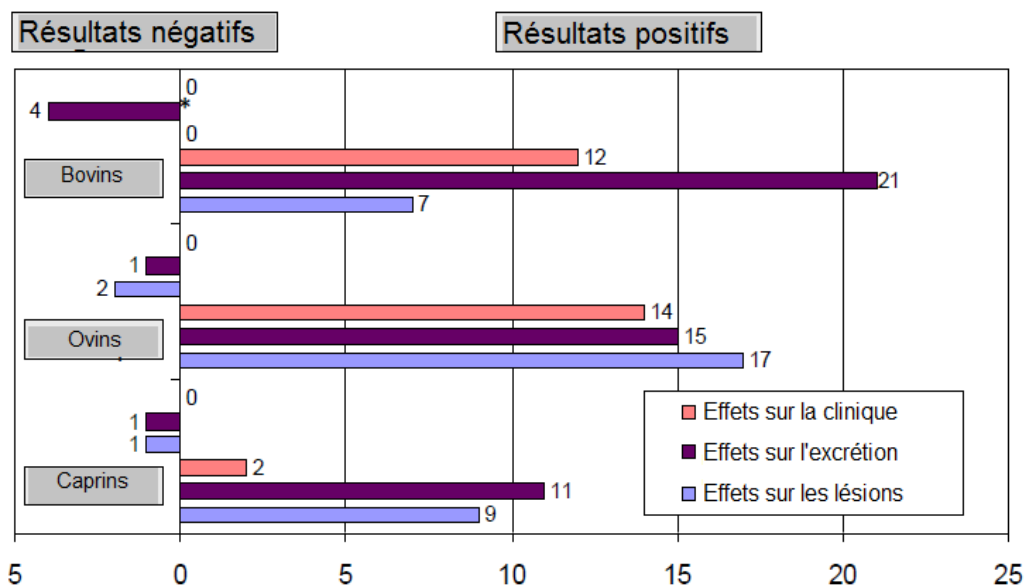
I.4.2.4. Résultats de la vaccination

I.4.2.4.1. Etudes sur l'efficacité vaccinale (en général)

Parmi les références publiées, l'efficacité des vaccins contre la paratuberculose a été montrée à plusieurs reprises et ceci dans les trois espèces cibles (bovins, ovins et caprins).

Bastida et Juste ont répertorié dans une méta-analyse publiée en 2011, toutes les études à propos de l'efficacité de la vaccination dans le contrôle de la paratuberculose. Au total, 118 études, basées sur l'utilisation des vaccins Néoparasec® ou Gudair®, ont été analysées (dont 5 réalisées en France). Les expériences ont été classées selon l'espèce (bovine, ovine ou caprine) et le type d'évaluation de l'efficacité du vaccin (effets sur la clinique, sur l'excrétion ou sur les lésions macroscopiques et/ou microscopiques). Les études rapportées sont soit des comparaisons groupe vacciné / groupe non vacciné (contrôle), soit des comparaisons temporelles avant/après vaccination.

La majorité des études montrent des résultats positifs de la vaccination quel que soit l'effet étudié (figure 9).



* Une expérience n'a montré ni résultat négatif ni résultat positif.

Figure 9 : représentation graphique des évaluations réalisées sur l'efficacité de la vaccination, regroupées par résultat en fonction de l'espèce animale et des effets analysés (production, épidémiologie ou pathogénicité). Les expériences avec des résultats négatifs sont représentées par les barres horizontales vers la gauche du graphique. Les expériences avec des résultats positifs sont représentées par les barres vers la droite du graphique. Les nombres adjacents aux barres correspondent au nombre d'expériences.

Quarante-neuf études ont été réalisées pour l'espèce ovine (décrites dans 21 publications). Parmi elles, 14 études ont montré une réduction du nombre de cas cliniques ou du taux de mortalité, 15 études ont montré une réduction de l'isolement de *Map* dans les fèces ou tissus et enfin 17 études ont montré une réduction des lésions histopathologiques (observées après abattage).

Des résultats moyens obtenus pour les trois espèces de ruminants et pour les trois catégories d'effets sont proposés (tableau 11). Chaque résultat est un pourcentage de réduction calculé par le ratio : (fréquence lot témoin- fréquence lot vacciné) / fréquence lot témoin. Ce calcul est pondéré par la taille des effectifs impliqués dans les différentes études.

Tableau 11 : réduction de l'expression clinique, de l'excrétion ou des aspects lésionnels obtenus après vaccination contre la paratuberculose. (Chartier et al., 2013)

Type d'effets	Réduction du nombre de cas cliniques	Réduction du nombre d'excréteurs ou de la charge bactérienne excrétée	Réduction de l'intensité des lésions
Bovins	96% [35%,100%]*	72,6% [-36%, 99%]	57,5% [17%, 58%]
Ovins	67,5% [14%, 91%]	76,4% [-10%, 93%]	89,7% [-3%, 100%]
Caprins	45,1% [34%, 82%]	79,3% [-57%, 95%]	94,8% [-17%, 97%]

* Pourcentages moyens [minimaux, maximaux].

I.4.2.4.2. Etudes chez les ovins avec le vaccin Gudair®

Afin de pouvoir comparer les effets du vaccin Gudair® qui sont recherchés lors de notre étude avec ceux déjà connus, cette partie répertorie l'ensemble des études réalisées à ce sujet.

I.4.2.4.2.1. Etudes rapportées dans la méta-analyse de Bastida et Juste

La méta-analyse de Bastida et Juste (2011) ne répertorie que sept publications qui décrivent les effets du vaccin Gudair® chez les ovins. Le tableau 12 recense ces publications en mentionnant le nom du premier auteur, le pays et l'année de chaque publication ainsi que les effets du vaccin qui ont été étudiés.

Tableau 12 : liste des publications sur les effets du vaccin Gudair® chez les ovins et leurs caractéristiques

	Auteurs	Pays	Année	Effets étudiés		
				Clinique	Excrétion	Lésions
1	Reyes et al.	Espagne	2002			x
2	Windsor et al.	Australie	2003	x		
3	Eppleston et al.	Australie	2004	x	x	
4	Eppleston et al.	Australie	2005		x	
5	Reddacliff et al.	Australie	2006	x	x	x
6	Toribio et al.	Australie	2007		x	
7	Griffin et al.	Nouvelle-Zélande	2009	x	x	x

I.4.2.4.2.1.1. Modalités de ces études

Les modalités des 7 études précédentes sont données dans le tableau 13.

Tableau 13 : modalités des études répertoriées par Bastida et Juste (2011) sur les effets de la vaccination Gudair® chez les ovins

N° étude	Modalités d'étude		
	Elevage / animaux	Age de vaccination	Type d'étude
1	12 animaux	1 mois	Infection expérimentale Comparaison à un groupe contrôle
2	8000 animaux	3, 8 et 24 mois	Etude sur le terrain Comparaison pré-vaccination /post-vaccination
3	1200 animaux	1 à 4 mois	Etude de terrain Comparaison à un groupe contrôle
4	?	16 semaines	Etude de terrain Comparaison à un groupe contrôle
5	3 fermes Chaque ferme : 200 animaux vaccinés et 200 non vaccinés	1 à 3 mois	Etude de terrain Comparaison à un groupe contrôle
6	998 animaux	2 à 3 mois	Etude de terrain Comparaison à un groupe contrôle
7	65 animaux	4 mois	Infection expérimentale Comparaison à un groupe contrôle

I.4.2.4.2.1.2. Résultats de ces études

I.4.2.4.2.1.2.1. Résultats positifs

Les résultats de ces différentes études sont donnés dans le tableau 14.

Tableau 14 : effets du vaccin Gudair® sur la clinique, l'excrétion fécale et les aspects lésionnels obtenus dans les études répertoriées par Bastida et Juste (2011) chez les ovins

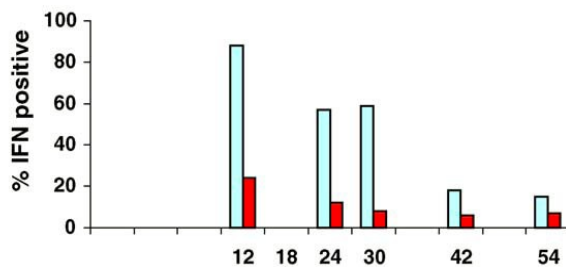
N° étude	Réduction du nombre de cas cliniques	Réduction du nombre d'excréteurs ou de la charge bactérienne excrétée	Réduction de l'intensité des lésions
1	-	-	100,0%
2	87,5%	-	-
3	90,0%	90,0%	-
4	-	52,2%	-
5	91,3%	84,1%	65,0%
6	-	76,1%	-
7	78,6%	25,3%	75,6%

Toutes ces études ont montré une réduction du taux de mortalité (jusqu'à 90% de réduction), une diminution du nombre d'excréteurs (jusqu'à 90%), une baisse du niveau d'excrétion et une

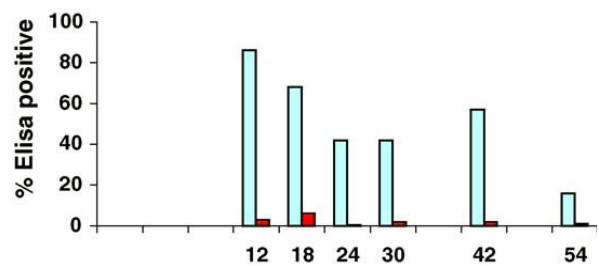
augmentation de l'âge à partir duquel l'excrétion est détectable. Le vaccin a également permis une réduction (d'environ 60%) du nombre d'animaux ayant des lésions de paratuberculose. Enfin, une forte réaction immunitaire de type cellulaire et humorale a été observée après vaccination.

Les effets du vaccin Gudair® sur les réponses immunitaires ont été décrits dans l'étude n°5 de Reddacliff *et al.* (2006). Les figures 10 et 11 montrent les proportions de brebis positives à l'IFN- γ et positives au test sérologique ELISA dans les groupes témoins et les groupes vaccinés des fermes étudiées.

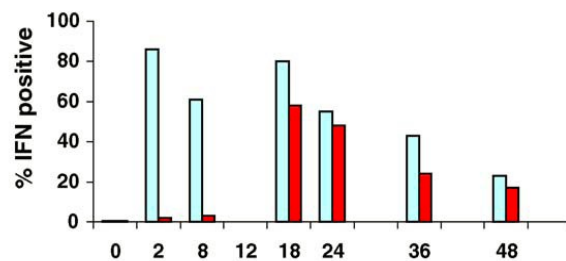
Property 1.



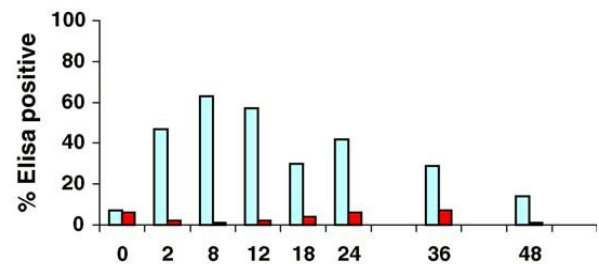
Property 1.



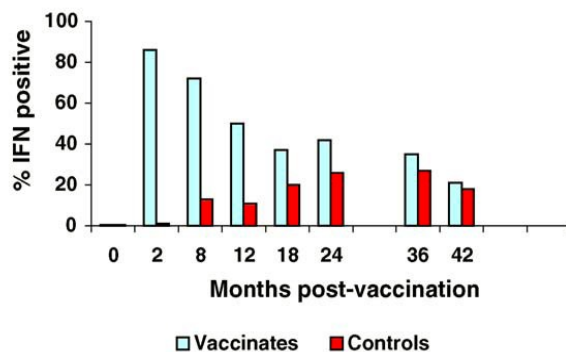
Property 2.



Property 2.



Property 3.



Property 3.

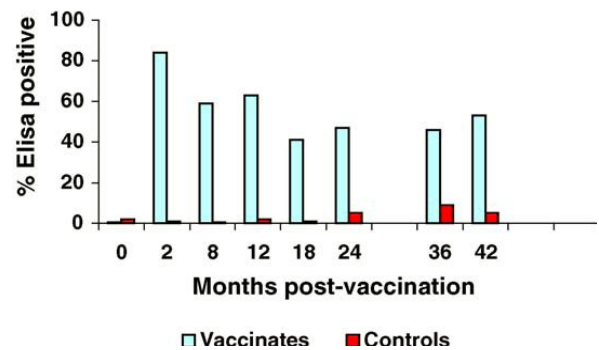


Figure 10 : proportion d'animaux positifs au test de détection de l'IFN (%IFN positive) pour chaque ferme (property) et chaque groupe: vaccinés et témoins (vaccinated and controls)

Figure 11 : proportion d'animaux positifs au test ELISA (%ELISA positive) pour chaque ferme (property) et chaque groupe : vaccinés et témoins (vaccinated and controls)

La stimulation par la vaccination des deux types de réponses immunitaires est mise en évidence par la proportion élevée d'animaux positifs pour les deux tests chez les vaccinés par rapport aux témoins et par l'augmentation rapide du nombre de positifs chez les vaccinés entre la vaccination et 2 mois post-vaccination (dans les fermes 2 et 3).

Parmi les animaux témoins (non-vaccinés), des réponses positives à l'IFN- γ ont été détectées 8 à 12 mois après le début de la vaccination et sont certainement dues à l'exposition de *Map* dans l'environnement. La proportion de réponses positives chez les vaccinés est maximale au premier test post-vaccination dans chaque ferme. Les proportions d'animaux positifs restent plus élevées chez les vaccinés que chez les non-vaccinés quel que soit le moment de prélèvement. Au 18e mois post-vaccination dans la ferme 2 et au 24e mois post-vaccination dans la ferme 3, le pourcentage de vaccinés positifs à l'IFN- γ augmente : ce qui peut indiquer que les vaccinés se retrouvent exposés à des niveaux d'infection plus élevés et que leur système immunitaire y répond.

Les réponses au test ELISA sont similaires dans les fermes 1 et 3, avec des hauts niveaux de séroconversion chez les vaccinés qui diminuent lentement jusqu'à environ 18 mois après vaccination et qui ensuite chutent rapidement. Dans la ferme 2, les anticorps contre *Map* sont présents chez 6% des agneaux au moment de la vaccination et peu de brebis ont séroconverti au premier test après vaccination par rapport aux autres fermes. Le pourcentage le plus élevé de positifs dans la ferme 2 s'élève à 63% au 8e mois alors qu'il atteint les 80% pour les 2 autres fermes. Au 24e mois post-vaccination, le pourcentage de positifs réaugmente dans la ferme 2 ce qui peut indiquer une réaction du système immunitaire mémoire face à des niveaux d'infection élevés. Parmi les individus non vaccinés, une séroconversion est observée vers 12 mois dans toutes les fermes, et la proportion de résultats positifs au test ELISA est la plus élevée entre le 18e et le 36e mois post-vaccination. Ces séroconversions reflètent probablement le développement progressif de la maladie.

I.4.2.4.2.1.2.2. Résultats négatifs

Les 7 études du tableau 12 ont également montré que le vaccin Gudair® n'était pas efficace à 100%. En effet, certains animaux vaccinés présentaient une excrétion fécale intense, et l'autopsie de ces animaux a montré qu'ils étaient porteurs des lésions multibacillaires.

I.4.2.4.2.2. Etudes réalisées après 2010

Une autre étude australienne (Windsor *et al.*, 2014) a été réalisée dans le but d'étudier la prévalence de l'infection évaluée sur la base de l'excrétion fécale, au moins cinq ans après le début d'une vaccination avec le vaccin Gudair®. Les trente-sept élevages étudiés présentaient initialement des prévalences variables. En bilan, une diminution significative de la prévalence a été observée mais dans 81.1% des troupeaux, une excrétion de *Map* dans les fèces a été détectée. Ces troupeaux ont été considérés comme source possible dans la propagation de la maladie et dans la recrudescence des pertes si la vaccination venait à être interrompue. Cette étude a permis de conclure sur la nécessité de continuer la vaccination au delà de 5 ans.

De plus, cette étude a permis d'identifier les facteurs à l'origine des variations de l'efficacité vaccinale. Les troupeaux vaccinés ayant accès à des parcelles fréquentées par des animaux non vaccinés présentaient une prévalence plus élevée. L'introduction d'animaux non vaccinés réduisait également l'efficacité vaccinale au sein des troupeaux vaccinés.

Une étude française (Mercier *et al.*, 2014) a été réalisée sur des chèvres dans le but d'évaluer l'efficacité du vaccin Gudair® sur des animaux vaccinés avant l'âge d'un mois. Cette étude portait sur deux élevages de chèvres laitières en France. Pour chaque élevage, la moitié des chevreaux a été vaccinée et l'autre moitié a été utilisée comme contrôle. Les résultats indiquent que les animaux vaccinés avaient une production laitière plus élevée, excrétaient *Map* moins fréquemment et que leurs réponses immunitaires étaient plus fréquemment détectables par rapport aux animaux non vaccinés.

II. DEUXIEME PARTIE : Étude expérimentale

II.1. Contexte

La paratuberculose est une maladie avec un impact économique majeur dans les filières ovines lait et viande. En Midi Pyrénées, le schéma de sélection et de production en race Causse du Lot est particulièrement affecté. Ce schéma est en effet basé sur une structure pyramidale à double étage reposant sur un petit nombre d'élevages sélectionneurs fournissant aux élevages utilisateurs et multiplicateurs des agnelles de race pure Causse du Lot (figure 12). Ainsi le risque d'introduction de la paratuberculose via ces agnelles est élevé et la maladie a assez largement diffusé dans les troupeaux au travers des introductions.

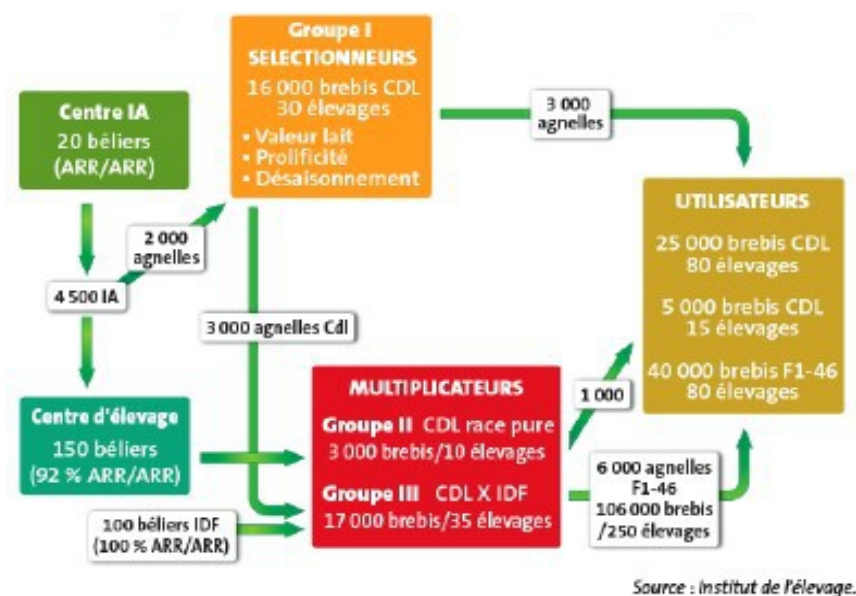


Figure 12 : schéma de production et de croisement double étage dans le Lot.

La vaccination est désormais mise en œuvre dans certains élevages infectés du Lot et semble avoir des répercussions positives en terme d'expression clinique de la maladie. La question de la durée d'application de la vaccination est souvent posée par les acteurs de ces filières. En effet, plusieurs questions se posent à ce sujet. Combien de temps doit-on vacciner dans les troupeaux infectés afin de limiter la résurgence de la maladie ? Doit-on renouveler le vaccin sur les animaux les plus âgés ? De plus, la vaccination n'empêchant pas l'infection et la présence d'animaux excréteurs au sein de troupeaux, quels sont la prévalence et le niveau de l'excrétion fécale de *Map* dans ces troupeaux ?

Notre étude tente de répondre à certaines de ces questions en évaluant la persistance de la réponse sérologique et l'effet de la vaccination sur l'excrétion de *Map* dans les fèces.

II.2. Objectifs de l'étude

L'objectif principal est d'étudier l'effet de la vaccination dans des troupeaux infectés par *Map* sur la réponse sérologique et l'excrétion dans les fèces de *Map*. Pour cela, la persistance de la réponse sérologique après vaccination a été évaluée à l'aide d'un test sérologique ELISA, et l'excrétion de *Map* dans les fèces a été mesurée à l'aide d'une méthode PCR. Enfin, la relation entre l'excrétion et le statut sérologique a été étudiée.

II.3. Population d'étude

II.3.1. Elevages

Les élevages de l'étude se situent dans le département du Lot (département 46) de la région Midi-Pyrénées. Le département compte plus de 750 éleveurs spécialisés et plus de 220 000 brebis déclarées. La race Causse du Lot y est majoritaire (50%). C'est une race rustique élevée pour la viande, sur les plateaux calcaires du Lot mais aussi dans le Tarn, le Tarn-et-Garonne et dans l'ouest de l'Aveyron. C'est une race sélectionnée depuis la moitié du XX^e siècle. A l'étage des élevages multiplicateurs et des utilisateurs, elle est croisée avec d'autres races (Ile de France, Berrichon du Cher, Charolais, Rouge de l'Ouest, Suffolk) pour améliorer la valeur bouchère des agneaux.

Parmi les 25 élevages (dont 16 sélectionneurs) ayant entrepris un programme de vaccination, 13 élevages sélectionneurs de race Causse du Lot (dont 1 élevage mixte : sélectionneur et multiplicateur) ont été inclus dans notre étude.

Le choix de travailler dans des élevages sélectionneurs repose sur plusieurs critères :

- absence d'introduction de brebis (et de mâles depuis 2012), limitant une interférence potentielle de l'introduction d'animaux excréteurs asymptomatiques ;
- exposition à *Map* globalement homogène par cohorte de naissance, les animaux étant tous nés dans l'élevage.
- traçabilité des animaux, en particulier dans les bases de données génétiques (non exploitées dans le cadre de cette thèse, mais qui le seront dans le cadre d'un programme plus large).

Les effectifs de brebis adultes en 2012 des élevages étudiés sont donnés dans le tableau 15.

La taille des troupeaux constituant l'échantillon de l'étude est variable, allant de 471 à 2000 brebis adultes (moyenne 935 +/- 502).

Tableau 15 : effectifs de brebis adultes des différents élevages de l'étude en 2012

Elevage	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Effectif (2012)	965	720	657	1060	2000	1900	471	640	480	684	822	540	1212

II.3.2. Statut sérologique entre 2009 et 2012

Dans tous les élevages inclus dans l'étude, la paratuberculose a été confirmée au moins une fois par autopsie d'une suspicion clinique et par la réalisation de sondages sérologiques entre 2009 et 2012. Les analyses sérologiques de sondage avant vaccination ont été réalisées par le Laboratoire Départemental d'Analyses Vétérinaires du Lot à l'aide du kit Idexx Paratuberculosis Screening Ab Test®. Dans certains cas, des animaux vaccinés avaient été inclus dans l'échantillon prélevé en élevage. Dans la très grande majorité des cas, ces animaux ce sont révélés séropositifs. Ils ont été exclus des calculs présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : résultats sérologiques à la paratuberculose dans les élevages étudiés entre 2009 et 2012

Campagne	2009-2010		2010-2011		2011-2012	
	# pos / # testés	% positifs	# pos / # testés	% positifs	# pos / # testés	% positifs
A	8 / 50	16,0%	-	-	-	-
B	7 / 50	14,0%	-	-	-	-
C	6 / 50	12,0%	6 / 51	11,8%	-	-
D	4 / 50	8,0%	4 / 50	8,0%	-	-
E	-	-	-	-	-	-
F	7 / 50	14,0%	11 / 50	22,0%	-	-
G	2 / 50	4,0%	6 / 39	15,4%	-	-
H	2 / 51	3,9%	1 / 49	2,0%	-	-
I	7 / 50	14,0%	-	-	-	-
J	3 / 50	6,0%	9 / 50	18,0%	12 / 40	30,0%
K	1 / 55	1,8%	12 / 50	24,0%	-	-
L	9 / 50	18,0%	-	-	-	-
M	5 / 50	10,0%	3 / 50	6,0%	4 / 50	8,0%

Le pourcentage d'animaux positifs parmi les animaux testés est variable d'un élevage à l'autre, allant de 1.8% à 30% (moyenne : 10.1% entre 2009 et 2010; 13.4% entre 2010-2011 ; 19% entre 2011-2012). Compte tenu de l'absence de représentativité systématique de la distribution

en âge des échantillons prélevés, il est difficile de parler ici de prévalence apparente et de comparer les élevages entre eux. Notons cependant que le pourcentage d'animaux séropositifs est globalement élevé.

II.3.3. Protocole de vaccination

La vaccination a été mise en place en 2009 sur le millésime (cohorte) de naissance 2010 dans tous les élevages inclus. Le protocole vaccinal a consisté, chaque année, en une injection sous-cutanée d'une dose du vaccin Gudair® sur les agnelles de renouvellement âgées d'environ 4 mois. Quatre millésimes de naissance étaient donc vaccinés lors de notre étude par ordre décroissant d'âge : 2013, 2012, 2011 et 2010.

II.3.4. Effectifs et prélèvements

Compte tenu de la taille des élevages, il était impossible de réaliser des prélèvements sur l'ensemble des animaux. Un échantillonnage a donc été décidé avec un objectif de 150 animaux par élevage, répartis sur 3 cohortes principales (2010-2012), permettant la mise en évidence d'une prévalence minimale de 4 à 7% (pour un test ayant une sensibilité de 50% ou 30% respectivement). Ainsi dans chaque élevage, l'objectif était de prélever 50 animaux par cohorte de naissance.

Au sein d'un élevage, les prélèvements ont été réalisés le même jour. Les animaux étaient sélectionnés au hasard dans la limite du nombre maximum par cohorte.

Sur chaque animal inclus ont été réalisées :

- une prise de fèces, directement dans le rectum, d'environ 10 à 15 grammes, à l'aide d'un gant à usage unique. En cas d'absence de fèces dans le rectum, la brebis n'était pas incluse dans l'échantillon et était remplacée par une autre. Les fèces ont été immédiatement transférées dans des sachets identifiés par un code d'élevage et le numéro de travail de la brebis.
- une prise de sang sur tube sec de 10 ml à la veine jugulaire (dans 5 élevages uniquement). Les tubes étaient identifiés par les mêmes codes. Après centrifugation,

le sérum étaient directement transmis en plaque de 96 puits, dont les plans ont été dressés à partir des codes d'élevage et des numéros de travail des brebis (plans de plaque : annexe 1). Les plaques ont été préparées en double.

Les échantillons ont été congelés à -20°C avant analyse.

Le tableau 17 résume le nombre d'animaux prélevés par cohorte pour chaque type de prélèvement. Certaines cohortes ont parfois des effectifs inférieurs à 50 animaux en raison de la disponibilité des animaux dans les bâtiments le jour de la collecte, ou de l'effectif total des troupeaux.

Tableau 17 : nombre d'animaux prélevés par cohorte pour les prélèvements de sang/fèces

Elevage	Date de prélèvement	Cohorte				Total
		2010	2011	2012	2013	
A	06/03/2014	53 / 54	54 / 56	50 / 49	0 / 0	157 / 159
B*	06/03/2014	36 / 36	54 / 54	51 / 53	0 / 0	141 / 143
C	07/03/2014	49 / 49	41 / 41	52 / 52	0 / 0	142 / 142
D	12/03/2014	52 / 51	53 / 54	44 / 44	20 / 20	169 / 169
E**	27/03/2014	0 / 0	0 / 0	81 / 81	0 / 0	81 / 81
F	01/12/2014	0 / 33	0 / 50	0 / 49	0 / 50	0 / 182
G	01/12/2014	0 / 49	0 / 50	0 / 46	0 / 53	0 / 198
H	10/12/2014	0 / 46	0 / 46	0 / 49	0 / 50	0 / 191
I	10/12/2014	0 / 30	0 / 32	0 / 49	0 / 60	0 / 171
J	10/12/2014	0 / 35	0 / 50	0 / 50	0 / 51	0 / 186
K	03/03/2015	0 / 51	0 / 47	0 / 50	0 / 52	0 / 200
L	26/03/2015	0 / 50	0 / 51	0 / 50	0 / 50	0 / 201
M	03/03/2015	0 / 24	0 / 51	0 / 50	0 / 53	0 / 178
Total		190 / 508	202 / 582	278 / 672	20 / 439	690 / 2201

* Cohorte 2013 non vaccinée dans cet élevage (20 prélèvements effectués dans cette cohorte)

** Elevage sélectionneur et multiplicateur : à moitié vacciné (176 prélèvements effectués dont 81 animaux vaccinés)

Aucun prélèvement sanguin n'a été effectué dans les élevages de F à M car les résultats des tests sérologiques des élevages de A à E ont suffi à conclure sur la persistance de la réponse sérologique après vaccination (cf. infra).

II.4. Matériels et méthodes

II.4.1. Evaluation du statut sérologique : ELISA

II.4.1.1. Kit ELISA et principe

Le statut sérologique post-vaccination a été évalué à l'aide d'un kit ELISA (ID Screen® Paratuberculosis Indirect, *ID.Vet, Montpellier, France*) à l'UMR 1225 INRA/ENVT IHAP. Ce kit met en évidence les anticorps dirigés contre *Map*. Il peut être utilisé sur des échantillons de sérums ou plasma de caprins, ovins et bovins ou sur du lait de bovin. Le protocole utilisé dans notre étude est fourni en annexe 2.

Le kit ELISA comprend une plaque de 96 puits sensibilisée avec de l'extrait purifié de *Map*. Au fond de chaque puits se trouve des antigènes de *Map* sur lesquels vont pouvoir se fixer des anticorps anti-antigène de *Map*, présents dans les échantillons de sérums.

Le test ELISA comporte 4 étapes principales :

- **Pré-incubation** : afin d'éviter des réactions croisées, les échantillons à tester et les contrôles sont pré-incubés dans un tampon neutralisant contenant *Mycobacterium phlei*, avant d'être transférés sur les plaques sensibilisées.
- **Fixation de l'anticorps recherché** : cette étape consiste à incuber les sérums obtenus, ainsi que les contrôles négatifs et positifs. A cette étape, les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes qui se trouvent au fond des puits. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés. Nous avons choisi une étape de fixation longue (une nuit entre 16 et 20 heures) afin de maximiser la sensibilité du test. Une étape plus courte (45min +/- 4min) est aussi proposée par le fabricant.
- **Fixation de l'anticorps de détection** : cette étape consiste à ajouter dans chaque puits des anticorps secondaires couplés à une peroxydase (le conjugué). Ce conjugué va reconnaître l'anticorps primaire recherché. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- **Révélation** : cette étape consiste à incuber un substrat spécifique à l'enzyme peroxydase qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être

transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés. Cette étape de révélation est stoppée par une solution d'arrêt qui induit une coloration jaune (figure 13).

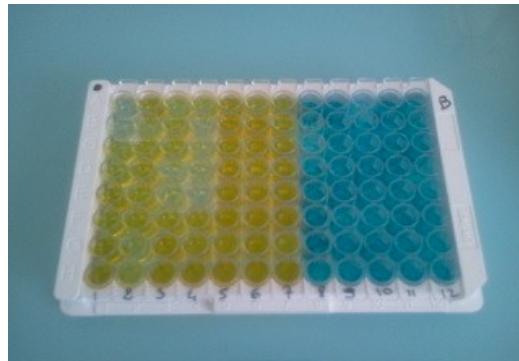


Figure 13 : étape de révélation stoppée par la solution d'arrêt

La figure 14 illustre les 3 dernières étapes.

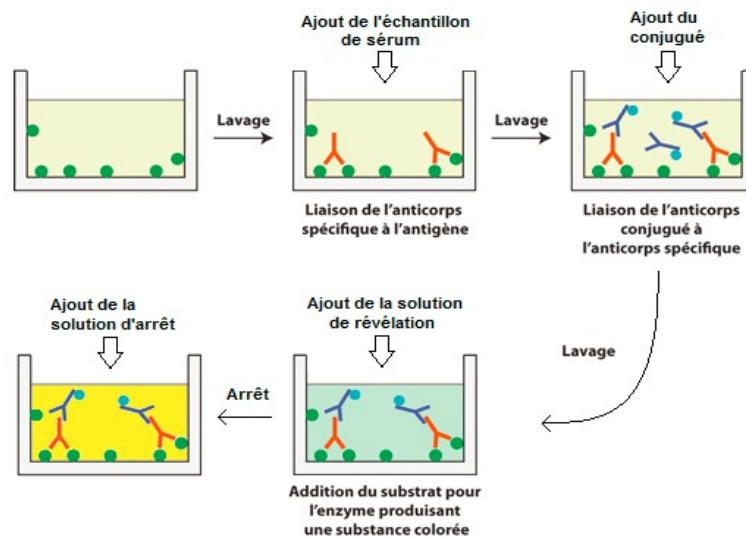


Figure 14 : étapes du test sérologique ELISA

La lecture des plaques est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre. Elle est effectuée à 450nm et 650nm. Par la suite, la différence des densités optiques entre ces 2 longueurs d'onde est calculée.

Le test est validé si :

- la valeur moyenne de densité optique des contrôles positifs (DO_{CP}) est supérieure à 0,350.
- le rapport entre la moyenne des contrôles positifs (DO_{CP}) et la moyenne des contrôles négatifs (DO_{CN}) est supérieur à 3.

Par la suite, le pourcentage S/P est calculé de la façon suivante :

$$S/P\% = ((DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{CN}}) / (DO_{\text{CP}} - DO_{\text{CN}})) \times 100$$

L'interprétation des résultats se fait alors de la façon suivante :

Résultat	Statut
S/P % ≤ 60 %	NEGATIF
60 % < S/P % < 70 %	DOUTEUX
S/P % ≥ 70 %	POSITIF

Dans l'analyse qui suivra, nous avons également retenu les S/P% compris entre 50 et 60% comme étant des NEGATIFS à forte densité optique, dans le but de les comparer aux résultats PCR.

II.4.2. Evaluation de l'excrétion de *Map* dans les fèces : la qPCR

II.4.2.1. Kit PCR et principe

Une PCR quantitative (qPCR) directe en système TaqMan a été réalisée selon le protocole fourni par Adia-gène et à l'aide d'un kit ADIAVET. Le principe de ce test est de détecter un fragment d'ADN dans les échantillons de fèces et d'amplifier celui-ci afin de quantifier la présence d'ADN dans l'échantillon. Dans notre cas, le test repose sur l'amplification génique du segment d'ADN IS900 spécifique de *Map*. Le protocole utilisé dans notre étude est fourni en annexe 3.

Avant l'étape d'amplification, les échantillons sont préparés à l'extraction puis extraits. La préparation des échantillons comporte plusieurs étapes clés :

- **Réhydratation** des fèces pendant une nuit
- **Sédimentation** de 20 min après vortex
- **Concentration** de l'échantillon par **filtration** du surnageant avec un filtre ADIAFILTER
- **Centrifugation** et récupération du culot
- **Remise en suspension et broyage** du culot obtenu
- **Transfert** sur plaque (plans de plaque : annexe 1)

Ensuite, les acides nucléiques sont extraits puis purifiés. Pour cela, une étape de **lyse cellulaire** est réalisée à l'aide d'une protéinase K (digestion enzymatique). A cette étape, un contrôle externe d'extraction est inclus à nos échantillons. Celui-ci permet de vérifier les

étapes d'extraction et d'amplification pour chaque échantillon. Le test est considéré comme validé s'il répond aux caractéristiques données dans le tableau 18.

Tableau 18 : critères de validation des résultats qPCR

Contrôle	Témoin négatif qPCR	Témoin positif qPCR	Témoin positif d'extraction
FAM amplification *	Non	Oui	Oui
VIC amplification **	Non	Non/Oui	Non/Oui
Validation de	Absence de contamination pendant l'amplification	Amplification de la cible	Des étapes et d'amplification

* FAM amplification : lecture entre 450-500nm

** VIC amplification : lecture entre 523-568 nm

L'extraction est ensuite entièrement réalisée par l'automate KingFisher Flex (annexe 3). Celui-ci va capter les acides nucléiques à l'aide des billes magnétiques (purification).

Suite à l'extraction, les extraits d'ADN peuvent être amplifiés. Pour cela, un mélange réactionnel est ajouté aux extraits d'ADN des échantillons, à la gamme (préparée à partir d'ADN pur) et aux contrôles. Puis, les échantillons sont amplifiés dans le LightCycler 480.

Cette amplification comporte plusieurs étapes clés :

- la **dénaturation** : Les extraits d'ADN sont chauffés à 94°C ; ce qui engendre la séparation des brins d'ADN
- l'**hybridation** : la température redescend autour de 40-65°C ; ce qui provoque l'hybridation des amorces par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.
- L'**élongation** : la température réaugmente à 72°C ; ce qui permet à l'enzyme Taq de synthétiser les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces.

Les trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel le nombre de fragment d'ADN cible initial est normalement doublé. Une quarantaine de cycles est effectuée dans notre expérience de qPCR. Ainsi, après 40 cycles, notre ADN cible est amplifié 2⁴⁰ fois.

La PCR en temps réel ou qPCR combine par ailleurs l'amplification et la révélation des produits amplifiés grâce à la détection d'un signal fluorescent. Ce signal fluorescent est émis à chaque cycle ce qui permet de suivre l'amplification en temps réel. Le procédé utilisé dans notre étude est le procédé TaqMan. Ce dernier est fondé sur l'utilisation d'un petit fragment d'ADN (20 à 40 bases) appelé sonde et possédant à son extrémité deux molécules particulières: un fluorophore R (Reporter) qui émet une fluorescence et un fluorophore Q (Quencher), molécule qui lorsqu'elle est proche de R empêche la fluorescence de celle-ci. Cette sonde TaqMan est spécifique d'un des deux brins de la molécule d'ADN initiale et vient se fixer entre les 2 amorces de la PCR au moment de l'hybridation puis est dégradée au moment de l'élongation. Cette dégradation a pour effet de libérer la molécule R qui émet alors sa fluorescence (éloignement de Q).

La figure 15 résume les différentes étapes de l'amplification avec utilisation d'une sonde TaqMan.

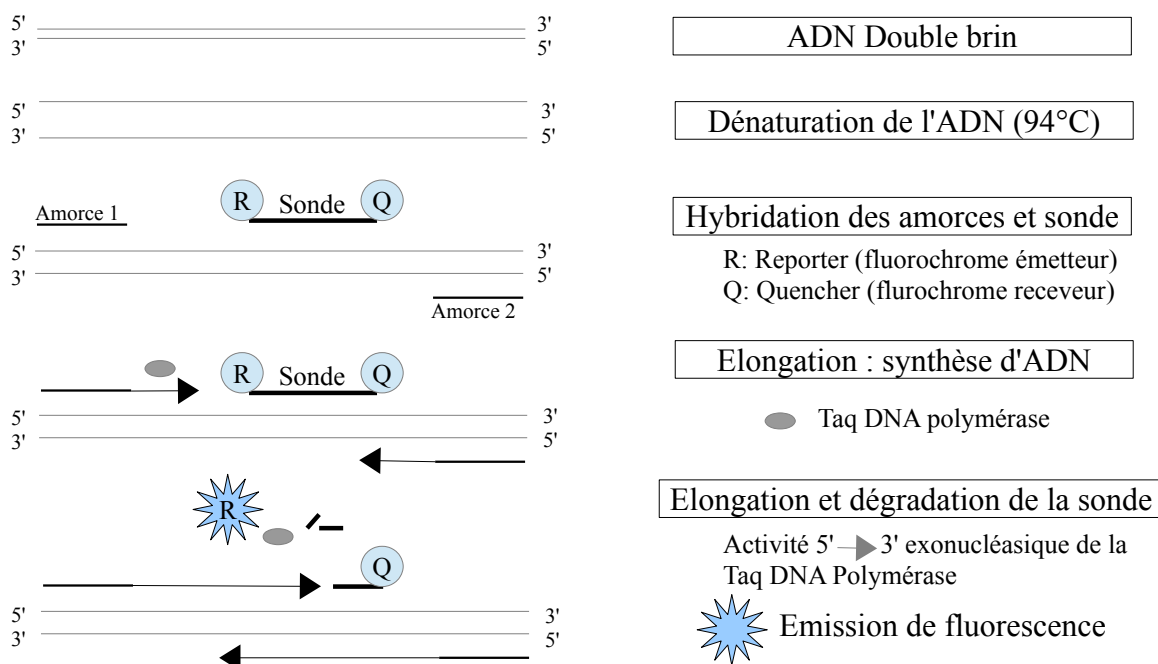


Figure 15 : amplification PCR avec utilisation d'une sonde TAQMAN (d'après ADIAGENE-AES laboratoire)

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la qPCR par le logiciel du LightCycler 480 et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant.

Au cours du temps, la fluorescence d'une PCR en temps réel augmente en 3 phases distinctes (figure 16) :

- **Phase de bruit de fond** : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour

générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée). La « ligne de base » (ou « base line ») correspond à ce bruit de fond et qualifie la partie non caractéristique des courbes observées pendant les premiers cycles de l'amplification

- **Phase exponentielle** : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil. Il apparaît alors un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (« cycle seuil » ou « threshold cycle ») et apparaît en début de phase exponentielle. Pour obtenir le Ct, une « ligne de seuil » (« threshold line ») doit être placée au dessus de la ligne de base, de préférence au point d'inflexion de la phase exponentielle d'amplification.
- **Phase de plateau (ou de saturation)** : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

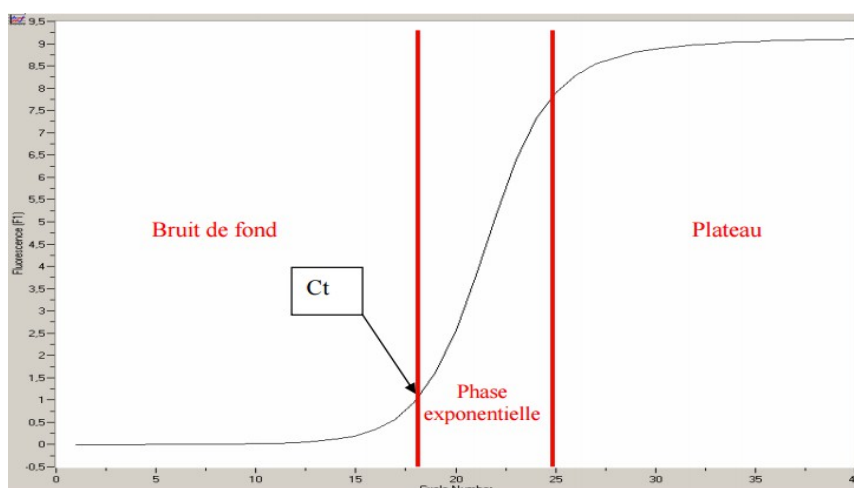


Figure 16 : exemple de "courbe d'amplification caractéristique" avec l'obtention du Ct

Le Ct obtenu pour chacun des échantillons est comparé au Ct du témoin positif de la PCR et le résultat exprimé est alors qualitatif (positif/négatif). Il est également comparé aux Ct obtenus avec les échantillons de référence (gamme de dilution) ainsi le résultat exprimé peut être quantitatif. De manière générale, plus le Ct est faible, plus l'échantillon contient une quantité importante d'ADN recherché.

II.4.2.2. Quantification de l'excrétion de *Map*

Une gamme de dilution a été réalisée afin d'évaluer la quantité de *Map* au sein des

échantillons. Cette dernière a été conçue à partir d'ADN génomique de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (souche de référence ATCC 19698). Plusieurs dilutions de cet ADN stock ont été effectuées afin d'obtenir une gamme avec 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 et 10^1 Equivalents génomes de *Map* par 5 μ L (volume d'une réaction de qPCR) (protocole en annexe 4). La figure 17 montre les courbes de fluorescence obtenues pour cette gamme de dilution. Chaque concentration était présente 3 fois sur la plaque (triplicate). Le tableau 19 donne les valeurs moyennes de Ct pour chacun des points de la gamme.

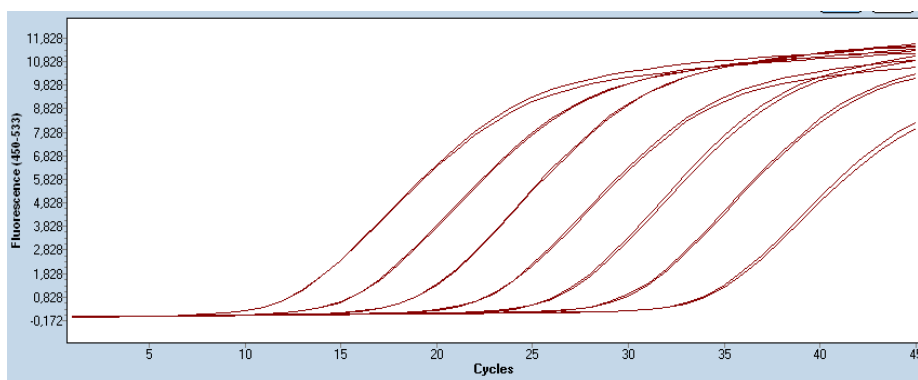


Figure 17 : courbes de fluorescence de la gamme de dilution (Light Cycler 480)

Tableau 19 : moyenne des Ct obtenus pour chaque point de la gamme (échantillons en triplicate)

Concentration (Eq bact/5 μ L)	Moyenne Ct
10^7	12,56
10^6	15,85
10^5	19,35
10^4	22,96
10^3	26,78
10^2	30,45
10^1	34,31

Le dernier point de dilution (correspondant à 10 bactéries par réaction PCR) a un Ct moyen de 34,3. Par déduction, 1 bactérie par réaction PCR (soit 15 copies d'IS900) a un Ct de 37,6. Selon cette gamme, notre test a une limite de détection de 10 bactéries par gramme de fèces, pour un Ct=40. Au delà de 40 cycles, les réactions de PCR sur le LightCycler 480 sont peu stables et l'interprétation des résultats est difficile. Par ailleurs le logiciel du LightCycler 480 ne fournit aucun résultat au delà de 40 cycles.

Pour chacune des plaques PCR réalisées, une gamme allant de 10^4 à 10^1 bactéries par réaction PCR a été amplifiée pour permettre de quantifier l'excrétion des échantillons positifs. Pour des raisons non encore identifiées, les valeurs de Ct obtenues pour ces gammes étaient variables

d'une plaque à l'autre et différentes de celles obtenues lors de la dilution allant de 10^7 à 10^1 bactéries par réaction PCR. Une moyenne arithmétique des Ct obtenus pour les gammes a été calculée (tableau 20). Pour cela, certaines gammes n'ont pas été prises en compte car elles se démarquaient trop nettement des autres en ayant un Ct tardif pour la dilution 10^1 (Ct supérieur à 36).

Tableau 20: moyenne arithmétique des Ct des gammes allant de 10^4 à 10^1 bactéries par réaction PCR

	Ct dilution 10^4	Ct dilution 10^3	Ct dilution 10^2	Ct dilution 10^1
Moyenne arithmétique	22,06	25,47	28,74	32,21

L'écart moyen entre les moyennes de Ct est proche de 3,3 cycles (correspondant à une dilution d'un facteur 10). Ainsi, les valeurs obtenues semblent correctes. En utilisant cette régression, notre test a une limite de détection de 2 bactéries par gramme de fèces (pour un Ct=40).

Cependant, les valeurs sont différentes de celles obtenues précédemment pour la gamme allant de 10^7 à 10^1 . En effet, le point de dilution 10^1 a un Ct = 32,2 contre 34,3 pour la première gamme de dilution.

A partir des valeurs obtenues, une régression logarithmique de la forme suivante a été calculée afin de quantifier au mieux les échantillons positifs :

$$\text{Log Concentration (en bactéries par réaction PCR)} = \alpha \times (\text{Moyenne Ct}) + \beta$$

Les valeurs de α et β obtenues sont les suivantes :

	α	β	r^2
Moyenne des plaques	-0.2965	10,5417	0,99988
1 ^{er} gamme de dilution	-0.2746	10,3668	0,99940

Pour quantifier nos résultats, nous avons choisi d'utiliser la première gamme de dilution allant de 10^7 à 10^1 bactéries et avec une sensibilité de détection de 10 bactéries par gramme de fèces. Les différences observées entre les gammes pourraient s'expliquer par des erreurs de manipulation ou par la dégradation de l'ADN lors de la confection des aliquotes des différents points de la gamme (dilution, congélation et décongélation). La première gamme a été réalisée directement à partir de l'ADN stock alors que pour les autres gammes, des aliquotes d'ADN préalablement diluées ont été utilisées.

II.5. Résultats

II.5.1. Tests ELISA

II.5.1.1. Séroprévalence et S/P moyen des brebis vaccinées

La séroprévalence observée (ou apparente) chez les ovins vaccinés était comprise entre 93.8% et 96.5% selon les élevages (tableau 21). Au total, 96.1% des animaux vaccinés (soit 663 animaux sur 690) étaient séropositifs, indiquant que la vaccination entraîne une réponse immunitaire humorale dans la quasi-totalité des cas. De plus, ces animaux sont fortement séropositifs d'après le S/P moyen calculé (largement supérieur au seuil de positivité de 70%); ceci indique que la vaccination entraîne une réponse sérologique forte.

Tableau 21: séroprévalence et S/P moyen dans 5 élevages vaccinés

Elevage	Pourcentage de résultats négatifs	Pourcentage de résultats douteux	Pourcentage de résultats positifs	S/P (%) moyen ± écart type parmi les résultats positifs
A	2,5%	1,3%	96,2%	157,13 ± 20,19
B	3,5%	0,0%	96,5%	165,43 ± 21,91
C	2,1%	1,4%	96,5%	166,86 ± 26,88
D	3,6%	0,0%	96,4%	169,64 ± 26,48
E	6,2%	0,0%	93,8%	165,51 ± 31,56

II.5.1.2. Séropositivité des brebis vaccinées par millésime

Dans chaque élevage, la séroprévalence est très forte quel que soit le millésime considéré. Elle varie de 92.6% à 100% (tableau 22). Il n'y a pas de décroissance significative du rapport S/P moyen d'un millésime à l'autre, indiquant que la vaccination entraîne une réponse sérologique forte et durable.

Tableau 22 : résultats de sérologie ELISA dans 5 troupeaux vaccinés, par élevage et cohorte de naissance

Elevage	Millésime 2010		Millésime 2011		Millésime 2012		Millésime 2013	
	% POS	S/P moy	% POS	S/P moy	% POS	S/P moy	% POS	S/P moy
A	94,3%	161,74 ± 22,68	94,4%	149,11 ± 15,83	100,0%	160,69 ± 19,39	-	-
B	97,2%	157,88 ± 17,21	92,6%	176,9 ± 16,80	100,0%	159,48 ± 24,65	-	-
C	91,8%	156,11 ± 17,35	97,6%	152,5 ± 25,52	100,0%	187,19 ± 21,99	-	-
D	100,0%	167,64	96,2%	160,63	93,2%	172,77	95,0%	192,49

		± 30,90		± 26,81		± 18,38		± 6,49
E	-	-	-	-	93,8%	165,51 ± 31,56	-	-

Tous élevages confondus, la décroissance du titre des anticorps avec l'âge est très peu perceptible (tableau 23) et plus de 90% des animaux positifs ont un S/P supérieur à 125%, très largement supérieur au seuil de positivité de 70%. La sérologie ne peut donc pas être utilisée pour mettre en évidence de nouvelles infections par *Map* dans ces élevages.

Tableau 23 : résultats de sérologie ELISA par cohorte de naissance tous élevages confondus

Millésime	Nombre de positifs	Pourcentage de positifs	S/P (%) moyen ± écart type
2013	19	95,0%	192,49 ± 6,49
2012	271	97,5%	168,72 ± 26,47
2011	192	95,0%	160,12 ± 24,03
2010	182	95,8%	161,29 ± 23,62

La répartition des brebis faiblement séropositives (S/P compris entre 70 et 100%) est variable d'un élevage à l'autre (tableau 24). A l'échelle de tous les élevages, aucun millésime n'apparaît plus concerné qu'un autre.

Tableau 24 : nombre et pourcentage de brebis faiblement séropositives par cohorte de naissance dans 5 troupeaux vaccinés

Élevage	Millésime 2010		Millésime 2011		Millésime 2012		Millésime 2013	
A	1	1,9%	1	1,9%	1	2,0%	-	-
B	0	0,0%	0	0,0%	4	7,8%	-	-
C	1	2,0%	1	2,4%	0	0,0%	-	-
D	4	7,7%	3	5,7%	0	0,0%	0	0,0%
E	-	-	-	-	4	4,9%	-	-

II.5.1.3. Séronégativité des brebis vaccinées par millésime

Les brebis négatives ou douteuses au test ELISA (S/P < 70%) sont présentes dans tous les millésimes étudiés (tableau 25). La répartition de ces brebis au sein de chaque élevage est variable. A l'échelle de tous les élevages, aucun millésime n'apparaît plus concerné qu'un autre.

Tableau 25 : nombre et pourcentage de résultats négatifs/douteux par cohorte de naissance dans 5 troupeaux vaccinés

Elevage	Millésime 2010		Millésime 2011		Millésime 2012		Millésime 2013	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
A	3	5,7%	3	5,6%	0	0,0%	-	-
B	1	2,8%	4	7,4%	0	0,0%	-	-
C	4	8,2%	1	2,4%	0	0,0%	-	-
D	0	0,0%	2	3,8%	3	6,8%	1	5,0%
E	-	-	-	-	5	6,2%	-	-

II.5.2. qPCR sur fèces

II.5.2.1. Positivité au sein des élevages et cohortes

Sur un total de 2201 animaux testés, 70 (soit 3,2%) sont positifs à la qPCR (tableau 26). 12 élevages sur 13 ont au moins un animal excréteur. Ces résultats indiquent que la vaccination n'empêche pas l'excrétion de *Map* dans les fèces.

Le nombre d'individus excréteurs par élevage est généralement faible (0 à 7 individus, prévalence de 0 à 3,9%), excepté pour les élevages I et J où le nombre de brebis positives s'élèvent respectivement à 33 (soit une prévalence de 19,3%) et 12 (soit un prévalence de 6,5%).

Tableau 26 : résultats positifs à la qPCR sur fèces dans les 13 élevages vaccinés

Elevage	Effectif	Nombre de brebis positives en qPCR	Pourcentage de brebis positives en qPCR
A	159	1	0,6%
B*	143	2	1,4%
C	142	3	2,1%
D	169	1	0,6%
E**	81	0	0,0%
F	182	2	1,1%
G	198	5	2,5%
H	191	2	1,0%
I	171	33	19,3%
J	186	12	6,5%
K	200	2	1,0%
L	201	0	0,0%
M	178	7	3,9%
Total	2201	70	3,2%

* hors 20 brebis du millésime 2013 non vaccinées

** hors 95 brebis non vaccinées

Lorsque plusieurs animaux excréteurs étaient retrouvés dans un élevage, ils appartenait à plusieurs cohortes de naissance, de sorte qu'à l'échelle de tous les élevages aucun millésime n'est apparu plus touché que les autres (tableau 27). Il apparaît cependant que le pourcentage d'animaux positifs au sein de la cohorte 2013 (5,5%) est supérieur à celui observée pour les autres cohortes, en raison du grand nombre de brebis excrétrices (19/60) observées dans cette cohorte dans l'élevage I (élevage ayant le plus d'animaux excréteurs).

Tableau 27 : résultats positifs à la qPCR en fonction des millésimes de naissance

Cohorte	Effectif prélevé	Nombre de positifs en qPCR	Pourcentage de positifs en qPCR au sein de chaque cohorte
2010	508	15	3,0%
2011	582	18	3,1%
2012	672	13	1,9%
2013	439	24	5,5%

II.5.2.2. Valeurs de Ct

Les échantillons positifs à la qPCR ont un Ct supérieur à 34 dans la majorité des cas (figure 18) ; soit une quantité de bactéries inférieure à 450 bactéries par gramme, selon l'équation de prédiction issue de la première gamme de dilution.

Nombre de brebis ayant un Ct compris dans l'intervalle

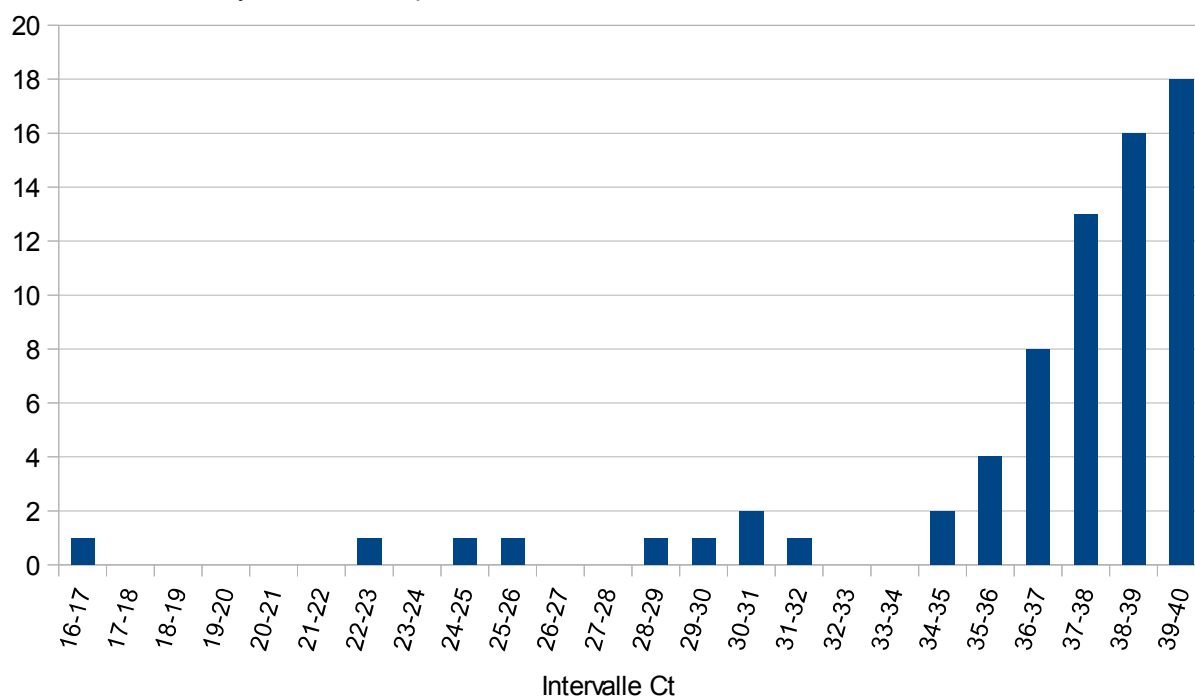


Figure 18 : distribution des résultats de qPCR chez les animaux positifs (Ct < 40 cycles)

II.5.2.3. Niveau d'excrétion

II.5.2.3.1. Individuel

La majorité des animaux positifs sont faiblement excréteurs c'est-à-dire que leur niveau d'excrétion est inférieur à 2000 UFC/g (tableau 28). Cependant, il persiste 5 individus fortement excréteurs et 4 individus modérément excréteurs pouvant être à l'origine d'une contamination marquée de l'environnement.

Tableau 28 : classification des animaux testés selon leur niveau d'excrétion (selon la classification Crossley et al., 2005)

Excrétion			Nombre d'animaux
Qualification	Statut	Niveau d'excrétion	
Forts excréteurs	Positifs +++	> 10 000 UFC/g	5
Modérément excréteurs	Positifs ++	2000 à 10 000 UFC/g	4
Faibles excréteurs	Positifs +	< 2000 UFC/g	61
Non excréteur	Négatif	-	2131

Une classification plus détaillée des valeurs d'excrétion (tableau 29) permet de constater que près de 90% des individus excréteurs n'excrètent pas plus de 1000 bactéries par gramme de fèces.

Tableau 29 : niveaux d'excrétion des individus positifs

Niveau d'excrétion (bactéries/gramme)	Nombre d'individus excréteurs	Pourcentage d'individus excréteurs
10 - 100	52	74,3%
100 - 1000	9	12,9%
1000 - 10 ⁴	4	5,7%
10 ⁴ - 10 ⁵	2	2,9%
10 ⁵ - 10 ⁶	2	2,9%
> 10 ⁶	1	1,4%

II.5.2.3.2. Par cohorte

Pour la plupart des élevages, le cumul de l'excrétion par cohorte est faible (<1000 bactéries/gramme). Lorsque le cumul de l'excrétion dans une cohorte donnée est élevé, il est le reflet de l'excrétion d'un ou 2 individus fortement excréteurs.

II.5.3. Relation entre l'excrétion et le statut sérologique

Tous les animaux ayant un résultat négatif ou douteux au test ELISA ont un résultat négatif à la qPCR (tableau 30). Les 7 animaux positifs à la qPCR (parmi les élevages de A à E) sont tous positifs au test ELISA.

Tableau 30 : relation entre les résultats de qPCR et d'ELISA pour les élevages de A à E

	Sérologie négative		Sérologie douteuse		Sérologie positive	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
PCR négative	23	3,3%	4	0,6%	658	95,1%
PCR positive	0	0,0%	0	0,0%	7	1,0%

Les 7 individus ayant répondu positivement à la qPCR ont tous un S/P supérieur à 150 % : ce qui indique une forte réponse sérologique. Ces brebis sont faiblement à fortement excrétrices puisque leur excrétion va de 14,5 bactéries par gramme à 11274,5 bactéries par gramme. Il n'existe pas de relation entre le niveau d'excrétion et le S/P (tableau 31).

Tableau 31 : relation entre l'excrétion et le S/P(%) parmi les cas positifs à la qPCR (élevages de A à E)

Elevage	Identité	Cohorte	Résultat PCR		Résultat Sérologie
			Ct	Excrétion (bactérie/gramme)	S/P (%)
A	GD00679	2010	36,71	80,7	180,5
B	EC01046	2010	37,36	53,5	156,4
	EC01503	2010	30,36	4477,9	170,6
C	MO01010	2010	36,73	79,7	162,2
	MO10123	2011	39,42	14,5	170,7
D	MO20406	2012	36,13	116,5	211,9
	GA00306	2010	28,9	11274,5	200,6

Les brebis identifiées comme étant faiblement séropositives (S/P compris entre 70 et 100%) ne se sont pas révélées positives à la qPCR.

II.6. Discussion

II.6.1. Matériel et méthodes

II.6.1.1. Population d'étude et prélèvements

Le nombre d'élevage inclus dans notre étude (13) et le nombre total d'animaux prélevés semblent satisfaisants pour l'interprétation de nos résultats. En revanche, les élevages de notre étude ont des effectifs totaux différents, une pression d'infection initiale différente et des conditions d'élevage diverses (notamment les mesures sanitaires sont différentes entre élevage). Ainsi, les résultats obtenus sont difficilement comparables entre élevage.

Tous les élevages ont été vaccinés à partir de la cohorte 2010. Cependant, il se peut que les conditions de vaccination diffèrent d'un élevage à l'autre (âge précis à la vaccination généralement effectuée par lots). Ces informations n'étaient cependant pas disponibles. En outre, les agnelles ont été vaccinées vers l'âge de 3-4 mois (après sevrage et sélection des agnelles de renouvellement). Cet âge est plutôt tardif par rapport à d'autres études.

D'un élevage à l'autre, le nombre d'animaux prélevés diffère. L'objectif initial était de prélever environ 50 animaux par cohorte pour chaque élevage. Cet objectif a été difficile à respecter pour diverses raisons (animaux non disponibles le jour du prélèvement ou cohorte non vaccinée). Par conséquent, la représentativité de chacune des cohortes est différente d'un élevage à l'autre ; et sur le nombre total d'animaux prélevés la cohorte 2013 est moins représentée.

II.6.1.2. Examens de laboratoire (aspect technique)

La quantité de fèces mise en suspension lors de la préparation des échantillons à la PCR était variable selon les individus. Dans la majorité des cas, la quantité prélevée permettait de mettre en suspension 10 grammes de fèces mais pour 13.4 % des échantillons la quantité de fèces prélevées était inférieure à 10 grammes de fèces (de 3 à 9 grammes). Quelle que soit la quantité de matière fécale disponible, cette dernière était diluée dans 7 volumes d'eau déminéralisée stérile. Pour les échantillons où la quantité de fèces mise en suspension était inférieure à 10 grammes, la probabilité de détecter *Map* par qPCR semble plus faible. En effet, dans certains cas d'excrétion très faible, avec des bactéries qui ont tendance à rester en

amas, il est envisageable que la quantité de fèces prélevée ne contienne pas suffisamment de bactéries pour fournir un résultat positif. Ainsi, ces échantillons ont un risque plus élevé de donner des résultats faussement négatifs.

L'utilisation de l'ADIAFILTER permet une concentration préalable des échantillons et augmente de manière significative la détection de *Map* dans les fèces. La sensibilité est ainsi augmentée par rapport à un protocole de qPCR classique.

Pour chacune des plaques PCR réalisées, une gamme allant de 10^1 à 10^4 bactéries a été amplifiée. La valeur des différents Ct pour cette gamme était variable d'une plaque à l'autre. Cette variabilité peut s'expliquer par des erreurs de manipulation lors de la réalisation des gammes. En outre, cette gamme de dilution a permis de mettre en évidence une limite de détection de *Map* par la qPCR, variant de 2 à 10 bacilles par gramme de fèces selon les estimations. Ces seuils de détection montrent une bonne sensibilité du test.

L'utilisation d'un contrôle externe à l'extraction pour chacun des échantillons a permis de vérifier les étapes d'extraction et d'amplification, et notamment l'absence d'effet inhibiteur sur la réaction PCR. A ce sujet, quelques résultats (0.6%) n'ont pas été validés car le témoin positif d'extraction ne présentait pas de fluorescence (ou une fluorescence douteuse) en VIC. La présence d'inhibiteurs de la PCR (sels biliaires, poly-osides, ions Ca^{2+} , héparine, hémoglobine) est alors fortement suspectée.

L'utilisation de la séquence IS900 permet une grande sensibilité de détection puisqu'elle est présente à hauteur de 12 à 18 copies dans le génome de *Map*. Cependant, cette séquence est également présente chez d'autres mycobactéries ainsi les résultats PCR positifs ciblant cette séquence sont à prendre avec précaution. L'utilisation d'autres séquences telles que F57, Ismav2 et HspX, moins présentes dans le génôme de *Map* mais plus spécifiques, est discutable.

II.6.2. Résultats

II.6.2.1. Sérologie

Les résultats obtenus par ELISA montre que la vaccination est à l'origine d'une réponse immunitaire humorale forte et durable pour la grande majorité des individus vaccinés (96%).

En effet, les animaux séropositifs ont un S/P élevé quel que soit leur millésime. Aucune décroissance significative du titre des anticorps avec l'âge n'est observée. Ainsi la mise en évidence de nouvelles infections sur les animaux vaccinés n'est pas possible par l'utilisation de la sérologie ELISA (tout du moins avec la trousse commerciale utilisée dans notre étude). La stabilité de la réponse sérologique et le maintien d'un rapport S/P élevé au cours du temps pourrait s'expliquer par le protocole de vaccination mis en place, où les agnelles ont été vaccinées autour de 4 mois, soit entre 1 et 3 mois plus tard que pour les animaux inclus dans les études déjà publiées. Il pourrait en résulter une meilleure stimulation du système immunitaire expliquant les fortes fréquences et persistances des réponses anticorps post-vaccinales observées.

Certains titres en anticorps ne sont pas forcément le reflet d'une réponse vaccinale. Les résultats douteux ou les résultats positifs avec des S/P proches de 70% (seuil de positivité), peuvent correspondre à une réponse humorale post vaccinale de faible ampleur ou s'amenuisant mais aussi à une réponse humorale face à une infection naturelle par *Map* débutante (sans signes cliniques). La confirmation d'une possible infection par l'analyse PCR était alors intéressante. Celle-ci n'a pas été mise en évidence étant donné qu'aucune brebis séronégative ou faiblement séropositive ne s'est révélée positive à la qPCR.

Les résultats négatifs peuvent correspondre à l'absence de réponse sérologique ou à une mauvaise persistance de la réponse sérologique post-vaccinale. Ils peuvent être la conséquence d'un défaut de vaccination (oubli de vaccination ou mauvaise mise en oeuvre). Enfin, un manque de sensibilité du test ELISA (faux négatifs) ne peut pas être écarté.

Malgré la phase de pré-incubation du test ELISA, des anticorps dirigés contre d'autres mycobactéries présents chez les animaux testés peuvent être à l'origine de résultats faussement positifs.

La question de la différenciation d'un individu vacciné et d'un individu infecté se pose. Existe-t-il un seuil en dessous duquel il est plus probable que la réponse sérologique soit le reflet d'une infection et non de la réponse vaccinale ?

En parallèle de notre étude, des brebis issues d'élevages non vaccinés ont également été prélevées et testées avec la même trousse ELISA que les animaux des élevages vaccinés. Afin

de comparer les réponses sérologiques, 40 brebis vaccinées et 40 brebis non vaccinées ont été choisies aléatoirement. Les brebis vaccinées et non vaccinées ont été classées en fonction de leur valeur de S/P. La figure 19 indique que les valeurs de S/P obtenues chez les brebis non vaccinées et infectées se recoupent avec celles des brebis vaccinées. Ainsi, une brebis infectée ne peut pas être différenciée d'une brebis vaccinée par le test ELISA utilisé sur la base de la valeur de S/P.

En revanche, les valeurs de S/P obtenues chez les brebis vaccinées sont en moyenne plus élevées que chez les brebis infectées ($164,57 > 139,02$). De plus, les valeurs de S/P sont plus dispersées autour de leur moyenne chez les brebis non vaccinées que chez les brebis vaccinées (écart type des brebis non vaccinées : $45,97 >$ écart type des brebis vaccinées : $19,86$)

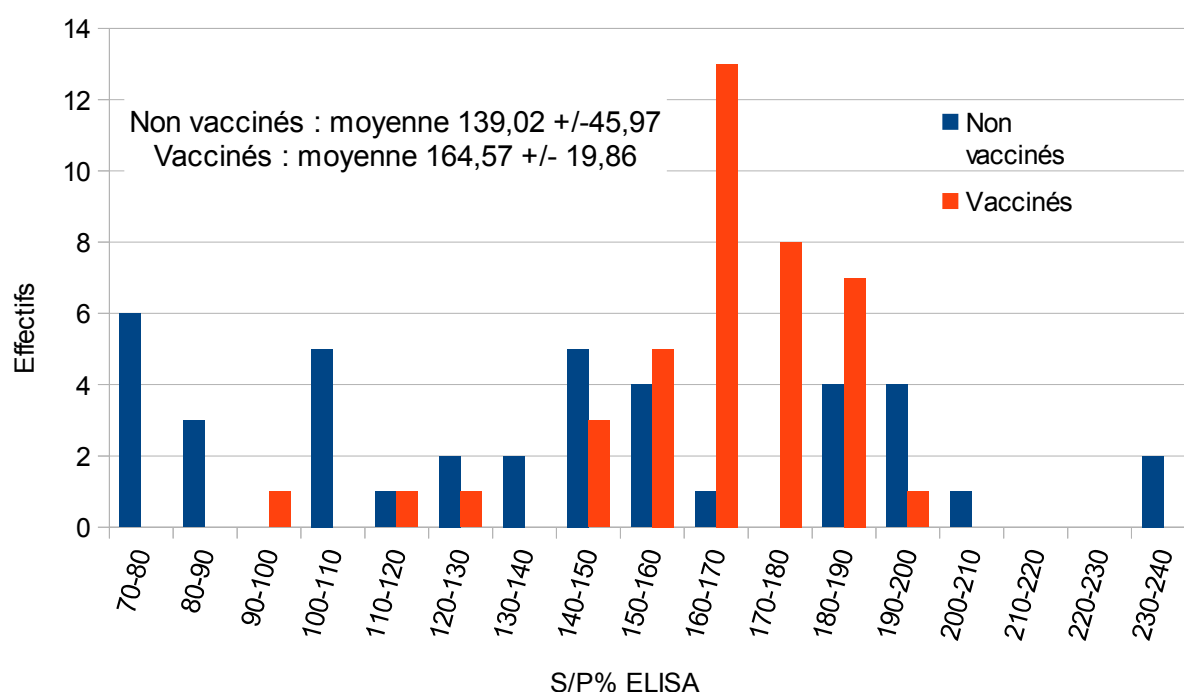


Figure 19 : effectifs de brebis vaccinées ou non vaccinées par classe de S/P%.

II.6.2.2. qPCR sur fèces

Des animaux excréteurs ont été mis en évidence par qPCR dans la quasi-totalité des élevages étudiés. Parmi les animaux excréteurs, des animaux fortement excréteurs (niveau d'excrétion supérieur à 10^6 bactéries par gramme) ont été identifiés. Ainsi, la vaccination n'empêche pas l'excrétion de *Map* dans les fèces.

La majorité des élevages étudiés ont une faible prévalence d'excrétion (inférieur à 5%). N'ayant pas de données sur l'excrétion fécale avant vaccination, il est difficile de décrire l'effet de la vaccination sur la prévalence d'excrétion. Cependant, au vu des résultats sérologiques et des cas cliniques relevés dans ces élevages avant vaccination, il semblerait que la vaccination est un effet bénéfique sur l'excrétion de *Map* dans les fèces. En supposant que la prévalence d'excrétion et la séoprévalence à l'échelle d'un élevage sont corrélées positivement, la vaccination permettrait une réduction de la prévalence d'excrétion.

Dans deux élevages la prévalence apparente d'excrétion est apparue relativement élevée (>5%), notamment dans l'élevage I (33 animaux excréteurs soit 19,3%) ce qui va à l'encontre des résultats obtenus dans la majorité des autres élevages vaccinés. Dans cet élevage I, deux brebis fortement excrétrices ont été identifiées par qPCR. Leur niveau d'excrétion s'élevait à 80000 et 28 000 000 bactéries par gramme de fèces. La brebis la plus fortement excrétrice est à l'origine d'une contamination importante pouvant expliquer une prévalence apparente d'excrétion élevée dans cet élevage. Nous ne disposons malheureusement pas de prélèvements sanguins dans cet élevage permettant de vérifier la bonne mise en place de la vaccination au travers des réponses sérologiques. Cette vérification apparaît souhaitable avant de statuer définitivement sur l'absence d'effet de la vaccination dans cet élevage.

Ces résultats supportent les résultats d'autres études (Reddacliff *et al.* 2006; Dhand *et al.* 2013) qui ont montré une réduction, mais pas d'extinction, de l'excrétion fécale de *Map* à la suite de la vaccination.

La majorité des élevages vaccinés ont des niveaux d'excrétion faibles (inférieurs à 1000 bactéries par gramme). Selon l'étude de Kralik *et al.* (2014) chez les bovins, un niveau d'excrétion inférieur à 1000 bactéries par gramme ne signifie pas automatiquement que l'animal est infecté. Un animal peut avoir ingéré le bacille avec de la nourriture contaminée (par exemple) et présenté un passage passif de *Map* à travers le tractus digestif sans causer son infection. Ainsi, il serait intéressant de renouveler une PCR sur les individus dont l'excrétion était faible pour mettre en évidence les animaux dont l'excrétion n'était que transitoire. En revanche, même si ces animaux ne sont pas infectés, ils représentent une source potentielle de contamination.

Etant donné que la dose orale permettant l'installation de l'infection chez les ruminants domestiques est estimée à 10^{4-7} CFU/animal, le risque de contamination d'origine fécale est

moindre dans les élevages où il n'y a que des individus faiblement excréteurs.

La présence de faux négatifs dans nos résultats est à envisager étant donné le caractère intermittent de l'excrétion de *Map* dans les fèces. Le prélèvement de fèces a pu être réalisé lorsque l'animal n'excrétait pas le bacille dans ses fèces.

De plus, lors de la préparation des échantillons, une quantité insuffisante de fèces, une mauvaise homogénéisation du prélèvement ou une faible concentration de *Map* dans l'échantillon peuvent être à l'origine de résultats faussement négatifs.

En outre, même si la spécificité de la PCR est proche de 100%, la présence de résultats faussement positifs dans notre étude ne peut pas être exclue. En effet, une contamination exogène des échantillons ou la présence d'autres mycobactéries dans les échantillons peuvent être à l'origine de faux positifs. De même comment considéré, d'un point de vue épidémiologique, les résultats ayant des Ct proches de 40 cycles. Doit-on les considérer comme réellement positifs ?

II.6.3. Relation entre le statut sérologique et l'excrétion

Les animaux identifiés comme étant excréteurs par la qPCR ont tous une forte réponse sérologique. Ce résultat indique que même si la vaccination engendre une forte réponse humorale, elle n'empêche pas l'excrétion de *Map* dans les fèces. Toutefois, elle réduit probablement le niveau d'excrétion puisque les individus positifs aux deux tests (PCR et ELISA) sont faiblement à moyennement excréteurs.

Il aurait été intéressant de réaliser les analyses sérologiques sur l'ensemble des élevages vaccinés pour comparer au mieux les différents niveaux d'excrétion avec la réponse sérologique associée.

CONCLUSION

Le premier objectif de notre étude était d'évaluer l'effet de la vaccination sur la réponse sérologique vis à vis de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Pour cela, 690 brebis appartenant à 4 cohortes de naissance (nées entre 2010 et 2013) de 5 élevages vaccinés à l'aide du vaccin Gudair® (parmi les 13 de notre étude) ont été prélevées et testées avec une trousse ELISA du commerce (ID Screen® Paratuberculosis Indirect). Les résultats sérologiques ont montré que la vaccination était à l'origine d'une réponse immunitaire humorale forte et durable. Nous avons en effet observé des taux d'anticorps élevés pour la quasi-totalité des brebis vaccinées sans décroissance avec l'âge. Ces résultats nous indiquent que l'apparition d'une nouvelle infection dans des troupeaux vaccinés ne peut pas être mise en évidence par la trousse ELISA utilisée dans notre étude.

Le deuxième objectif de notre étude était d'évaluer l'effet de la vaccination sur l'excrétion fécale de *Map*. Pour cela, les fèces de 2201 brebis de 4 cohortes de naissance (nées entre 2010 et 2013) des 13 élevages de notre étude ont été prélevées et analysées par qPCR (kit ADIAVET). Les résultats qPCR ont montré la présence d'animaux excréteurs dans la quasi-totalité des élevages étudiés, malgré la vaccination. Néanmoins, la prévalence d'excrétion était faible (<5%) pour la majorité des élevages de notre étude. En supposant que la séroprévalence initiale de ces troupeaux correspondait à une prévalence d'excrétion initialement élevée, la vaccination permettrait une réduction de la prévalence d'excrétion. De plus, les niveaux d'excrétion observés chez les brebis positives à la qPCR étaient faibles dans la majorité des cas (<2000 bactéries/gramme). Ainsi, la vaccination réduirait le risque et le niveau de contamination de l'environnement.

La mise en relation des résultats sérologiques avec ceux de qPCR a conforté l'idée que la sérologie ne pouvait pas être utilisée pour le suivi infectieux vis-à-vis de *Map* dans les troupeaux vaccinés. En effet, les animaux excréteurs (positifs à la qPCR) ont tous répondu de manière fortement positive au test ELISA, tout comme la majorité des brebis vaccinées non excrétrices.

Les observations faites dans notre étude sont en accord avec celles des éleveurs pour lesquels la vaccination a engendré une réduction de la mortalité et du nombre de réformes dans leur troupeau.

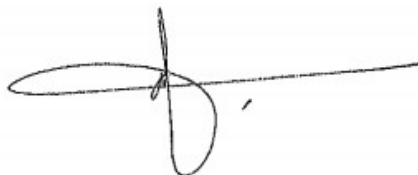
Etant donné la persistance d'animaux excréteurs dans les troupeaux vaccinés, il apparaît nécessaire de maintenir une vaccination sur le long terme afin d'éviter la résurgence de la maladie à l'arrêt de la vaccination. Toutefois, nous pouvons nous demander si l'arrêt de la vaccination ne peut pas être réalisée dans les élevages où la prévalence et les niveaux d'excrétion sont faibles. Cet arrêt éventuel de la vaccination ne pourrait être envisagé qu'en maintenant des mesures de surveillance adéquates (évaluation de nouvelles infections naturelles par réalisation de sondage et d'analyse en mélange, en ciblant les générations non vaccinées dans ces troupeaux) et des mesures sanitaires strictes (réforme des animaux excréteurs identifiés, contrôle des animaux introduits, isolement des animaux malades...). Le maintien d'une surveillance épidémiologique dans ces troupeaux permettrait une reprise de la vaccination dans les plus brefs délais s'il s'avérait que l'incidence de nouvelles infections naturelles était importante.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Fabien CORBIERE**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LAFORT Marie-Pierre** intitulée « *La paratuberculose chez les ovins : effet de la vaccination sur la réponse sérologie et l'excrétion fécale de Mycobacterium avium sp. Paratuberculosis (Map).* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

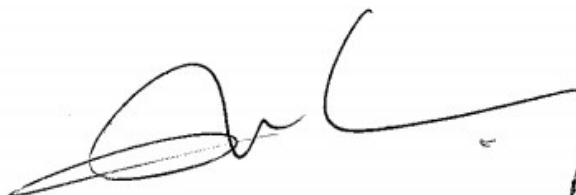
Fait à Toulouse, le 2 novembre 2015
Docteur **Fabien CORBIERE**
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse,
Isabelle CHMTEL




Vu :
Le Président du jury :
Professeur **Bruno MARCHOU**



Vu et autorisation de l'impression :
Administrateur Provisoire de
l'Université
Paul Sabatier
Monsieur **Amal SAYAH**



L'Administrateur Provisoire
Amal SAYAH



Melle **LAFORT Marie-Pierre**
a été admis(e) sur concours en : 2010
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 26/06/2014
a validé son année d'approfondissement le : 28/05/2015
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

- AFSSA (2009). Rapport sur la paratuberculose des ruminants. *Rapport d'expertise collective*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-Paratuberculose.pdf>, 87p.
- AYELE WY, MACHACKOVA M, PAVLIK I (2001). The Transmission and Impact of Paratuberculosis Infection in Domestic and Wild Ruminants. *Veterinari Medicina*, **46** (7–8) : 205–224.
- BASTIDA F, JUSTE RA (2011). Paratuberculosis Control: A Review with a Focus on Vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, **9** (1) : 1-17.
- CIRILLO JD, FALKOW S, TOMPKINS LS, BERMUDEZ LE (1997). Interaction of Mycobacterium Avium with Environmental Amoebae Enhances Virulence. *Infection and Immunity*, **65** (9) : 3759–3767.
- CHARTIER C, DUFOUR B, FOUCRAS G, VIALARD J (2013). Vaccination contre la paratuberculose chez les ruminants : état des lieux. *Le Point Vétérinaire*, (334) : 62-67.
- CHIODINI RJ, VAN KRUININGEN HJ, MERKAL RS (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, **74** (3) : 218–262.
- CLARKE CJ, LITTLE D (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *Journal of comparative pathology*, **114** (4) : 419-437.
- COLLINS DM., GABRIC DM, and DE LISLE GW (1990). Identification of Two Groups of Mycobacterium Paratuberculosis Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, **28** (7): 1591–1596.
- CROSSLEY BM, ZAGMUTT-VERGARA FJ, FYOCK TL, WHITLOCK RH, GARDNER IA (2005). Fecal shedding of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by dairy cows. *Veterinary microbiology*, **107** (3-4) : 257-263.
- DELGADO L. GARCIA MARIN JF, MUNOZ M, BENAVIDES J, JUSTE RA, GARCIA PARIENTE C, FUERTES M, GONZALEZ J, FERRERAS MC, PEREZ V (2013). Pathological Findings in Young and Adult Sheep Following Experimental Infection With 2 Different Doses of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis. *Veterinary Pathology*, **50** (5) : 857–866.
- DHAND NK, TORIBIO JA, WHITTINGTON RJ (2009). Adsorption of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis to Soil Particles. *Applied and Environmental Microbiology*, **75** (17) : 5581–5585.
- DHAND NK, JOHNSON WO, EPPLESTON J, WHITTINGTON RJ, WINDSOR PA (2013). Comparison of pre- and post-vaccination ovine Johne's disease prevalence using a Bayesian approach. *Preventive Veterinary Medicine*, **111**(1-2) : 81-91.
- EPPLESTON J, WINDSOR PA (2007). Lesions Attributed to Vaccination of Sheep with

Gudair™ for the Control of Ovine Paratuberculosis: Post Farm Economic Impacts at Slaughter. *Australian Veterinary Journal*, **85** (4): 129–133.

FISCHER OA, MATLOVA L., DVORSKA L., SVASTOVA P, BARTOS M, WESTON RT, KOPECNA M, TRCKA I, PAVLIK I (2005). Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis spread by syrphid flies in infected cattle farms. *Medical and Veterinary Entomology*, **19** (4) : 360-366.

GRIFFIN JF, HUGHES AD, LIGGETT S, FARQUHAR PA, MACKINTOSH CG, BAKKER D (2009). Efficacy of novel lipid-formulated whole bacterial cell vaccines against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in sheep. *Vaccine*, **27** (6) : 911-918.

HILBINK F, WEST D (1990). The antibody response of sheep to vaccination against Johne's disease. *New Zealand Veterinary Journal*, **38** (4): 168-169.

JORGENSEN JB (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nordisk Veterinær Medicin*, **29** : 267-270.

KAWAJI S, BEGG DJ, PLAIN KM, WHITTINGTON RJ (2011). A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of a direct faecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep. *Veterinary Microbiology*, **148** (1) : 35–44.

KIM SG, SHIN SJ, JACOBSON RH, MILLER LJ, HARPENDING PR, STEHMAN SM, ROSSITER CA, LEIN DA (2002). Development and Application of Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay Based on the ABI 7700 System (TaqMan) for Detection and Quantification of *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **14** (2) : 126–131.

KRALIK P, PRIBYLOVA-DZIEDZINSKA R, KRALOVA A, KOVARCIK K, SLANA I (2014). Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a Limousin cattle herd. *Veterinary Journal*, **201** (1) : 91-94.

KRISHNAN MY, MANNING EJB, COLLINS MT (2009). Comparison of Three Methods for Susceptibility Testing of *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis to 11 Antimicrobial Drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64** (2) : 310–316.

LARSEN AB, MERKAL RS, VARDAMAN TH (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, **17**: 549-551.

LI L, BANNANTINE JP, ZHANG Q, AMONSIN A, MAY BJ, ALT D, BANERJI N, KANJILAL S, KAPUR V (2005). The Complete Genome Sequence of *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (35) : 12344–12349.

LOVELL R, LEVI M, FRANCIS J (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Path.*, **54**, 120-129.

MERCIER P (2008). Paratuberculose (Maladie de Johne). Manuel terrestre de l'OIE 2008, Chapitre 2.1.11. p302-318.

- MERCIER P, MESI F, MEMETEAU S (2011). Paratuberculose : éléments d'épidémiologie et description du plan de lutte français. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, (47), <https://pro.anses.fr/bulletin-epidemiologique/Documents/BEP-mg-BE47-art1.pdf> (consulté le 13.10.2015).
- MERCIER P, BREMAUD I, GAUTIER MP (2014). Vaccination of Kids under One Month of Age with a Killed Vaccine and Reduction in the Frequency of Faecal Shedding of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis. *Small Ruminant Research*, **121** (2–3): 425–433.
- MOMOTANI E, WHIPPLE DL, THIERMANN AB, CHEVILLE NF (1988). Role of M Cells and Macrophages in the Entrance of Mycobacterium Paratuberculosis into Domes of Ileal Peyer's Patches in Calves. *Veterinary Pathology Online*, **25** (2) : 131–37.
- MUHAMMED SI, ELIASSON EC (1979). The prevalence of antibodies to Mycobacterium johnei in colostrum deprived lambs. *The Veterinary Record*, 105 (1) : 11-12.
- MUNOZ M, GARCIA MARIN JF, GARCIA PARIENTE C, REYES LE, VERNA A, MORENO O, FUERTES M, DOCE J, PUENTES E, GARRIDO J, PEREZ V (2005). Efficacy of a killed vaccine (SILIRUM®) in calves challenged with MAP.” In *Proceedings of 8th International Colloquium on Paratuberculosis; Copenhagen, Denmark*. Edited by: Manning EJB, Nielsen SS. *International Association for Paratuberculosis*; p 208-217.
- NIELSEN SS, TOFT N (2008). Ante Mortem Diagnosis of Paratuberculosis: A Review of Accuracies of ELISA, Interferon- γ Assay and Faecal Culture Techniques. *Veterinary Microbiology*, **129** (3–4) : 217–235.
- NIELSEN SS, TOFT N (2009). A Review of Prevalences of Paratuberculosis in Farmed Animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, **88** : 1–14.
- PETIT H (2006). La paratuberculose des petits ruminants : résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose. *Le Point Vétérinaire*, (263) : 46-50.
- PEREZ V, GARCIA MARIN JF, BADIOLA JJ (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, **114** (2) : 107-122.
- REDDACLIFF LJ, EPPLESTON J, WINDSOR P, WHITTINGTON R, JONES S (2006). Efficacy of a Killed Vaccine for the Control of Paratuberculosis in Australian Sheep Flocks. *Veterinary Microbiology*, **115** (1–3): 77–90.
- REYES LE, GONZALES J, BENAVIDES J (2002). Nuevos adyuvantes en la vacunación frente a la paratuberculosis ovina. *XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, SEOC; Spain*. Edited by: Peris Palau B, P. MP, LA M, GM A. *SEOC*, 758-761.
- ROWE MT, GRANT IR (2006). Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis and Its Potential Survival Tactics. *Letters in Applied Microbiology*, **42** (4): 305–11.
- SCHROEN C, MCDONALD W, BUTLER K, CONDRON R, HOPE A (2000). Survival of

Mycobacterium paratuberculosis in the environment. *Meat and Livestock Australia*, ISBN 1-74036-408-2

SEVILLA I, GARRIDO JM, GEIJO M, JUSTE RA (2007). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profile Homogeneity of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Isolates from Cattle and Heterogeneity of Those from Sheep and Goats. *BMC Microbiology*, **7** (18): 1-15.

TORIBIO JA, SERGEANT E (2007). A Comparison of Methods to Estimate the Prevalence of Ovine Johne's Infection from Pooled Faecal Samples. *Australian Veterinary Journal*, **85** (8) :317-324.

WHAN L, GRANT IR, ROWE MT (2006). Interaction between Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis and Environmental Protozoa. *BMC Microbiology*, **6** : 63.

WHITTINGTON RJ, LLOYD JB, REDDACLIFF LA (2001). Recovery of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis from Nematode Larvae Cultured from the Faeces of Sheep with Johne's Disease. *Veterinary Microbiology*, **81** (3) : 273–279.

WHITTINGTON RJ, MARSHALL DJ, NICHOLLS PJ, MARSH IB, REDDACLIFF LA (2004). Survival and Dormancy of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (5) : 2989–3004.

WHITTINGTON RJ, MARSH IB, REDDACLIFF LA (2005). Survival of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Dam Water and Sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (9) : 5304–5308.

WHITTINGTON RJ, MARSH IB, SAUNDERS V, GRANT IR, JUSTE R, SEVILLA IA, MANNING EJB, WHITLOCK RH (2011). Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates from Different Hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, **49** (5) : 1822–1830.

WINDSOR PA, EPPLESTON J, SERGEANT E (2003). Monitoring the efficacy of Gudair™ OJD vaccine in Australia. *Proc Aust Sheep Vet Soc*, **13** : 114-122.

WINDSOR PA, EPPLESTON J, DHAND NK, WHITTINGTON RJ (2014). Effectiveness of Gudair™ vaccine for the control of ovine Johne's disease in flocks vaccinating for at least 5 years. *Australian Veterinary Journal*, **92** (7) : 263-268

ANNEXE 1 : Plans de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
B	CN	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
C	CP	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
D	CP	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
F	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
G	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
H	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Légende : CN = Contrôle négatif, CP = Contrôle Positif, E = Echantillons

Figure 20 : plan de plaque pour les tests ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	CN	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
B	CP	CP	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
C	D10 ⁴	D10 ⁴	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
D	D10 ³	D10 ³	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
E	D10 ²	D10 ²	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
F	D10 ¹	D10 ¹	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82
G	1	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
H	2	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84

Légende : CN = Contrôle négatif ; CP = Contrôle Positif ; D10^x = Point de dilution 10^x ; 1 à 84 = Echantillons

Figure 21 : plan de plaque pour la qPCR

ANNEXE 2 : Protocole du test ELISA à partir du Kit ID Screen® Paratuberculosis Indirect.

Préparation de la Solution de lavage

- Si nécessaire, ramener la Solution de lavage concentrée (20X) à température ambiante (21°C +/- 5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.
- Préparer la Solution de lavage (1X) par dilution au 1/20ème de la solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée (soit 20mL dans 380mL d'eau distillée).

Mode opératoire

1. Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C +/- 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.
2. Dans une plaque de pré-dilution format 96 puits, diluer les échantillons et contrôles au 1/12ème avec le tampon de dilution 6. Pour cela, distribuer :
 - * 10 µL de contrôle négatif dans les cupules A1 et B1
 - * 10 µL de contrôle négatif dans les cupules C1 et D1
 - * 10 µL de chaque échantillon dans les cupules restantes
 - * 110 µL de Tampon de dilution 6 dans chaque puits.
3. Incuber entre 5 min et 45 min à 21°C (+/- 5°C).
4. Transférer 100µL des contrôles et échantillons préalablement neutralisés dans les plaques ELISA sensibilisées.
5. Incuber une nuit entre 16 et 20 heures à 4°C (+/- 2°C).
6. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µL de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
7. Préparer le Conjugué en diluant le Conjugué Concentré au 1/25ème avec le Tampon de dilution 3.
8. Distribuer 100µL de Conjugué dilué dans chaque cupule.
9. Incuber 30 min +/- 3min à 21°C (+/- 5°C).
10. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µL de Solution de lavage.
11. Distribuer 100µL de Solution de révélation dans chaque cupule.
12. Incuber 15 min +/- 2min à 21°C (+/- 5°C) à l'obscurité.
13. Distribuer 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
14. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

ANNEXE 3 : Protocole de la qPCR

1. Préparation des échantillons

- Décongélation des prélèvements 12h avant traitement.
- Homogénéisation des prélèvements : écraser les fèces à l'aide d'un rouleau.
- Mise en pot des prélèvements (figure 22) : pour chaque échantillon, déposer 10 grammes de fèces dans le pot identifié avec le code élevage et le numéro de travail. Si la quantité de fèces est insuffisante (inférieure à 10g), noter la quantité de fèces obtenue sur le pot.



Figure 22 : mise en pot d'un échantillon de fèces

- Congélation des pots à -20°C ou mise en suspension

2. Mise en suspension

- Décongélation des pots quelques heures avant la mise en suspension (si nécessaire)
- Mise en suspension (figure 23) : déposer 7mL d'eau bidistillée pour 1 gramme de fèces (dilution au 1/7e), soit 70mL d'eau bidistillée pour 10g de fèces



Figure 23 : mise en suspension d'un échantillon de fèces

- Vortexer chacun des pots au moins 10 secondes.
- Numérotter les pots de 1 à 84 (correspondant aux emplacements sur la plaque PCR).
- Compléter le plan de plaque avec le code élevage et le numéro de travail de chaque échantillon.
- Laisser reposer les pots pendant toute une nuit à température ambiante.

3. Filtration

- Préparer les tubes à filtration (figure 24) : Numéroté les tubes de 1 à 84. Déposer un filtre bleu dans chaque tube puis mettre un bouchon.



Figure 24 : préparation des tubes à filtration

- Vortexer les pots des échantillons par lot de 10 et laisser sédimenter pendant 20 minutes.
- Prélever 10 mL du surnageant dans chaque pot et le déposer dans les tubes à filtration correspondants (figure 25).



Figure 25 : filtration

- Fixer les bouchons des tubes à l'aide de parafilm.

4. Centrifugation

- Centrifuger les tubes 5 minutes à 3000g.
- Après centrifugation, vérifier l'obtention d'un culot au fond de chaque tube (figure 26). Si besoin, renouveler une la centrifugation.
- Vider le surnageant de chacun des tubes et jeter le filtre. Refermer chaque tube à l'aide du bouchon.



Figure 26 : culot après centrifugation

5. Mise en suspension et broyage

- Mettre chacun des culots en suspension dans 500 μ L d'eau bidistillée
- Transvaser dans des microtubes contenant 300 mg de poudre de verre (préparés extemporanément) (figure 27)

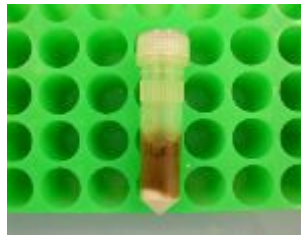


Figure 27 : microtube

- Broyage : Paramétrer le broyeur Precellys 24 (figure 28) de façon à réaliser 3 cycles de 30 secondes à 6800 rpm avec des pauses de 30 secondes entre chaque cycle.



Figure 28 : broyeur Precellys 24

- Après broyage, placer les microtubes dans de la glace pour les refroidir.
- Centrifuger les microtubes 5 minutes à 15 000g.
- Transférer 100 μ L du surnageant de chacun des microtubes dans une plaque « à puits profonds » en respectant le plan de plaque.
- Filmer la plaque avec un film aluminium et congeler la plaque à -70°C (si nécessaire).

6. Extraction de l'ADN par l'automate KingFisher 96/Flex

- Décongélation de la plaque « échantillon » quelques heures auparavant.
- Centrifugation de la plaque « échantillon » 2 minutes 400 rpm.
- Préparation de la protéinase K : dissoudre la poudre protéinase K dans 2,6mL de Prot.Buffer
- Lyse mécanique : dans chacun des puits « échantillon », ajouter 100 μ L de tampon T1 + 10 μ L de protéinase K + 5 μ L d'EPC-E (Contrôle externe d'extraction) et incubé la plaque 15 minutes à 56°C.
- Pendant l'incubation, répartir les différents tampons dans chaque plaque numérotée de 1 à 5 (tableau 32).

Tableau 32 : répartition des tampons dans les plaques numérotées de 1 à 5

Numéro de plaque	Type de plaque	Volumes et tampons
1	Deep Well KF96	600µL de tampon de capture dans chaque puits échantillon
2	Deep Well KF96	350µL de MB3 dans chaque puits échantillon.
3	Deep Well KF96	350µL de MB4 dans chaque puits échantillon.
4	Deep Well KF96	350µL d'éthanol 80% dans chaque puits échantillon
5	Elution KF96	60µL de MB6 dans chaque puits échantillon

- Transférer 200µL de la plaque échantillon dans la plaque 1.
- Charger l'automate (figure 29) : emplacement 1 pour la plaque 1, emplacement 2 pour la plaque 2 ... emplacement 5 pour la plaque 5. Sur l'emplacement 6, placer une plaque Elution KF96 et des cônes de protection pour prélèvement de l'automate (TIP Plate).

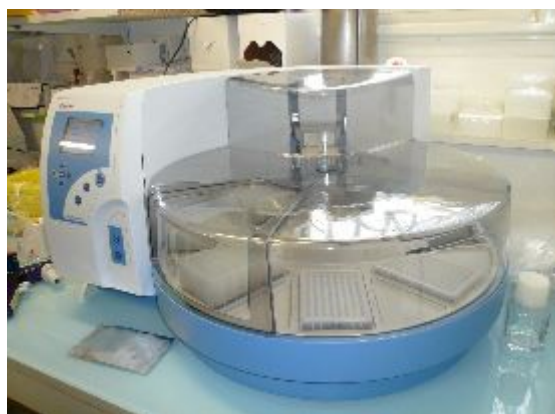


Figure 29 : automate KingFisher 96/Flex

- Lancer l'extraction.

Les extractions des acides nucléiques ADN et ARN sont toutes réalisées avec la même programmation d'automate. Le tableau 33 décrit le programme utilisé.

Tableau 33 : programme de l'automate KingFisher 96/Flex

Plaque	Description
1	Libération des acides nucléiques et fixation aux billes magnétiques Capture des billes par les barreaux magnétiques et transfert dans la plaque 2
2	Libération des billes. Lavage dans le tampon MB3. Capture des billes par les barreaux magnétiques et transfert dans la plaque 3
3	Libération des billes. Lavage dans le tampon MB4. Capture des billes par les barreaux magnétiques et transfert dans la plaque 4
4	Libération des billes. Lavage en éthanol 80%. Capture des billes par les barreaux magnétiques, séchage hors des puits et transfert dans la plaque 5
5	Elution des acides nucléiques. Capture des billes dépourvues d'acides nucléiques et transfert dans la plaque 3

- Récupérer la plaque 5 contenant les acides nucléiques. Filmer la plaque avec un film aluminium et la conserver à -70°C (si nécessaire).

7. Amplification

Préparation de la plaque « amplification » selon le plan de plaque (annexe 1)

- Déposer en A1 et A2, $5\mu\text{L}$ d'eau PPI (témoins négatifs)
- Déposer en B1 et B2, $5\mu\text{L}$ de PARA Positive Control (témoins positifs)
- Déposer en C1 et C2, $5\mu\text{L}$ d'extrait d'ADN de *Map* « Dilution 10^4 »
- Déposer en D1 et D2, $5\mu\text{L}$ d'extrait d'ADN de *Map* « Dilution 10^3 »
- Déposer en E1 et E2, $5\mu\text{L}$ d'extrait d'ADN de *Map* « Dilution 10^2 »
- Déposer en F1 et F2, $5\mu\text{L}$ d'extrait d'ADN de *Map* « Dilution 10^1 »
- Transférer $5\mu\text{L}$ d'extraits ADN de la plaque 5 dans la plaque « amplification » (figure 30)

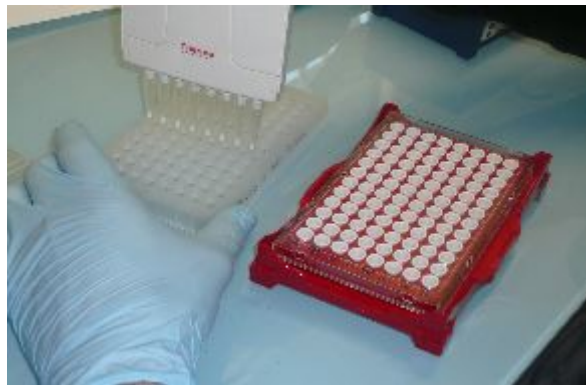


Figure 30 : transfert des extraits d'ADN

- Répartir dans tous les puits $20\mu\text{L}$ de « Amplification solution A5 »
- Replacer immédiatement les extraits d'ADN à -20°C .
- Filmer la plaque « amplification »

- Réaliser l'amplification par PCR temps réel dans le LightCycler 480 (figure 31) programmé à l'avance.

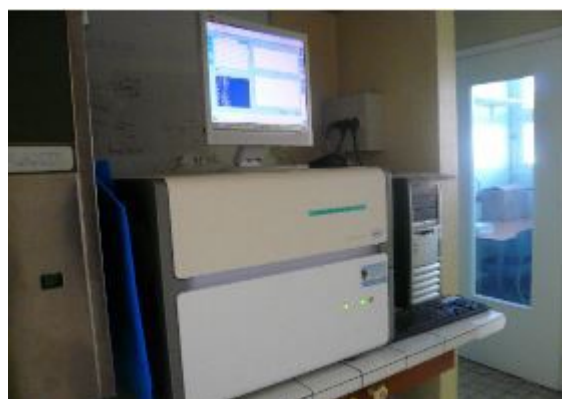


Figure 31 : LightCycler 480

ANNEXE 4 : Protocole de réalisation de la gamme de dilution

Données :

- Concentration de l'ADN stock de *Map* : 185 ng/ μ L
- Masse d'une mole de génome de *Map* : $0,53 \cdot 10^{-14}$ g

- **Préparation du premier point de gamme (10^7 Equivalent génome de *Map*)**

10^7 Equivalent génome de *Map* = $0,053 \cdot 10^{-6}$ g = 53 ng

10^7 Equivalent génome de *Map* dans 5 μ L \Leftrightarrow 53ng dans 5 μ L \Leftrightarrow 10,57 ng/ μ L

Dilution de l'ADN stock de *Map* par 17,5 (=185/53) \Rightarrow diluer 10 μ L ADN stock dans 165 μ L dH₂O

- **Préparation des autres points de la gamme**

Point 2 (10^6 Equivalent génome de *Map*) : diluer 10 μ L du point 1 dans 165 μ L dH₂O

Point 3 (10^5 Equivalent génome de *Map*) : diluer 10 μ L du point 2 dans 165 μ L dH₂O

Point 4 (10^4 Equivalent génome de *Map*) : diluer 10 μ L du point 3 dans 165 μ L dH₂O

Point 5 (10^3 Equivalent génome de *Map*) : diluer 10 μ L du point 4 dans 165 μ L dH₂O

Point 6 (10^2 Equivalent génome de *Map*) : diluer 10 μ L du point 5 dans 165 μ L dH₂O

Point 7 (10^1 Equivalent génome de *Map*) : diluer 10 μ L du point 6 dans 165 μ L dH₂O

- **Réalisation de la qPCR Adiavet**

Pour chacun des points de la gamme, mélanger 5 μ L d'ADN ainsi préparé avec 20 μ L de réactif qPCR. Suivre le même protocole d'amplification que pour les échantillons.

Toulouse, 2015

NOM : LAFORT

PRENOM : Marie-Pierre

TITRE : La paratuberculose chez les ovins : effet de la vaccination sur la réponse sérologique et l'excrétion fécale de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (*Map*)

RESUME : La paratuberculose ovine est une infection chronique incurable due à *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (*Map*). Sa longue période d'incubation et sa clinique non spécifique rendent son diagnostic difficile. De nos jours, la vaccination est possible chez les ovins (vaccin Gudair®) et semble avoir des effets bénéfiques sur l'expression clinique de la maladie.

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'effet de ce vaccin sur la réponse sérologique et l'excrétion de *Map* dans les fèces. Pour cela, des examens sérologiques (kit ELISA du commerce) couplés à des analyses qPCR sur fèces ont été réalisés sur plus de 2200 brebis appartenant à 4 cohortes de naissance vaccinées dans 13 élevages infectés du Lot. Les résultats sérologiques montrent que la vaccination est à l'origine d'une réponse immunitaire humorale forte et durable, rendant inutile l'utilisation de la sérologie pour le suivi de nouvelles infections dans ces troupeaux. Les résultats de qPCR indiquent que la vaccination réduit, sans toutefois l'annuler, la prévalence d'excrétion, réduisant fortement le risque de contamination de l'environnement.

MOTS CLES : paratuberculose, ovins, vaccination, sérologie, excrétion, ELISA, qPCR

TITLE : Paratuberculosis in sheep: effect of vaccination on serological response and *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (*Map*) faecal shedding.

ABSTRACT : Paratuberculosis in sheep is a chronic and fatal infection due to *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (*Map*). The long incubation period and the nonspecific clinical signs make its diagnosis difficult. Nowadays, vaccination is allowed in France in sheep (Gudair® vaccine) and appears to reduce the clinical expression of the disease.

This work aimed at studying the effect of vaccination on serological response and *Map* faecal shedding. Serological analyzes using a commercial ELISA kit and qPCR analyzes on feces were performed on 4 vaccinated birth cohorts in 13 infected flocks in south-west France (Lot). Serological results showed that vaccination induces a strong and long lasting humoral immune response, making the use of ELISA unusefull for the monitoring of new natural infections in vaccinated flocks. qPCR's results indicated that vaccination reduces the fecal shedding prevalence, preventing heavy environmental contaminations but does not fully prevents natural infections.

KEYMORDS : paratuberculosis, sheep, vaccination, serology, shedding, ELISA, qPCR