

EPIDEMIOLOGIE DE LA PARATUBERCULOSE DES RUMINANTS : CONSEQUENCES SUR LES MESURES DE CONTROLE ET DE PREVENTION

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2008
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Michaël CHASTEL

Né le 24 janvier 1982, à ARLES (Bouches-du-Rhône)

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Gilles FOUCRAS
M. François SCHELCHER

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

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELF
	M.	M. EECKHOUTTE
	M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2[°] CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DUCOS de LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle. **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores domestiques*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mme **BENNIS-BRET, Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCLAINVILLE –CAMUS, Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE)** *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologie, Histologie*
Mme **LETRON –RAYMOND, Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER –MEYNADIER, Annabelle**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
Mlle **GOSSOT Pauline**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **NOUVEL Laurent-Xavier**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **RATTEZ Elise**, *Médecine*
M. **REYNOLDS Brice**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VOLMER Romain**, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **BIBBAL Delphine**, *H.I.D.A.O.A Sciences de l'Alimentation*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
M. **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

REMERCIEMENTS :

A notre jury de thèse :

A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT,

Professeur des Universités,

Praticien hospitalier,

Bactériologie-Hygiène.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Gilles FOUCRAS,

Maître de Conférences, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie du bétail.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de notre thèse.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur François SCHELCHER,

Professeur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de basse-cour.

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

A mes parents, à Sandy, pour m'avoir aidé à me construire, à être tel que je suis aujourd'hui.
Mille fois merci...

A Virginie, pour tout ce qu'elle représente à mes yeux, ainsi qu'à sa famille.

A mon gros Ullan, pour son amitié et sa fidélité.

A mes amis, qu'ils soient de l'Ecole ou d'ailleurs. Restez tels que vous êtes... même toi
Tigrou...

A mes professeurs pour leurs enseignements, tout particulièrement à M. Schelcher.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES ANNEXES.....	11
INTRODUCTION.....	12
I. <u>EPIDEMIOLOGIE DE LA PARATUBERCULOSE</u>	14
I.1. <u>Epidémiologie descriptive</u>	14
I.1.1. <u>Espèces cibles</u>	14
I.1.1.1. <u>Animales</u>	14
I.1.1.1.1. <u>Ruminants et pseudo-ruminants</u>	14
I.1.1.1.2. <u>Non ruminants</u>	15
I.1.1.1.2.1. <u>Espèces sauvages répertoriées</u>	15
I.1.1.1.2.2. <u>Implications épidémiologiques</u>	15
I.1.1.1.2.3. <u>Voies de contamination des non-ruminants</u>	16
I.1.1.1.2.4. <u>Cas particulier du lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)</u>	16
I.1.1.1.2.4.1. <u>Isolement de <i>Map</i> chez des lagomorphes</u>	16
I.1.1.1.2.4.2. <u>Contamination entre espèces</u>	17
I.1.1.1.2.4.3. <u>Rôle épidémiologique du lapin</u>	17
I.1.1.2. <u>Existe-t-il un lien avec la maladie de Crohn ?</u>	18
I.1.2. <u>Répartition de la paratuberculose</u>	22
I.1.2.1. <u>Répartition dans l'espace</u>	22
I.1.2.1.1. <u>A l'échelle mondiale</u>	22
I.1.2.1.2. <u>A l'échelle de la France</u>	23
I.1.2.1.2.1. <u>Répartition de la paratuberculose des bovins en France</u>	23
I.1.2.1.2.2. <u>Répartition de la paratuberculose des petits ruminants en France</u>	24
I.1.2.2. <u>Evolution dans le temps</u>	27
I.1.2.2.1. <u>Effet de la saison sur la maladie et son expression</u>	28

I.2. <u>Epidémiologie analytique</u>	28
I.2.1. <u>Sources de contamination et matières virulentes</u>	28
I.2.1.1. <u>Sources de contamination</u>	28
I.2.1.2. <u>Matières virulentes</u>	28
I.2.2. <u>Facteurs de réceptivité de la paratuberculose des ruminants domestiques</u>	29
I.2.2.1. <u>Implication du système immunitaire</u>	29
I.2.2.2. <u>Conditions physico-chimiques au sein du tube digestif</u>	29
I.2.2.3. <u>Prédisposition génétique</u>	30
I.2.3. <u>Voies de contamination</u>	32
I.2.3.1. <u>Voies de contamination indirecte</u>	32
I.2.3.1.1. <u>Contamination oro-fécale par le biais de l'environnement, de l'eau ou des aliments</u>	32
I.2.3.1.2. <u>Contamination par voie respiratoire</u>	32
I.2.3.2. <u>Voies de contamination directe</u>	33
I.2.3.2.1. <u>Contamination par voie sexuelle</u>	33
I.2.3.2.2. <u>Contamination verticale (in utero)</u>	33
I.2.3.2.2.1. <u>Dans l'espèce bovine</u>	33
I.2.3.2.2.2. <u>Chez les petits ruminants</u>	34
I.2.3.2.2.3. <u>Risque inhérent à la transplantation embryonnaire</u>	34
I.2.3.2.3. <u>Contamination par le colostrum ou le lait (contamination pseudo-verticale)</u>	35
I.2.3.3. <u>Principaux facteurs de risque de la paratuberculose en élevage</u>	37
I.2.3.4. <u>Modèle infectieux expérimental</u>	38
I.2.3.4.1. <u>Difficultés rencontrées à l'établissement du modèle infectieux</u>	38
I.2.3.4.2. <u>Mécanismes généraux</u>	38
I.2.3.4.3. <u>Etude du modèle infectieux expérimental chez les petits ruminants domestiques</u>	39
I.2.3.4.3.1. <u>Les tonsilles pharyngiennes comme porte d'entrée ?</u>	40

I.2.3.4.4. <u>Etude du modèle infectieux expérimental chez les grands ruminants domestiques</u>	40
I.2.3.4.5. <u>La glande mammaire, réservoir et voie de contamination potentiels</u> ...	40
I.2.4. <u>Persistance</u>	42
I.2.4.1. <u>Persistance dans le sol</u>	42
I.2.4.1.1. <u>Facteurs influençant la persistance de <i>Map</i> dans le sol</u>	43
I.2.4.1.2. <u>Phénomène de dormance</u>	44
I.2.4.2. <u>Persistance dans les liquides et les sédiments</u>	45
I.2.4.3. <u>Persistance dans les matières organiques</u>	47
I.2.4.4. <u>Persistance chez les invertébrés et protozoaires</u>	48
I.2.4.4.1. <u>Invertébrés</u>	48
I.2.4.4.2. <u>Protozoaires</u>	49
I.2.5. <u>Résistance du bacille</u>	51
I.2.5.1. <u>Résistance aux agents chimiques</u>	51
I.2.5.2. <u>Résistance de <i>Map</i> dans les liquides</u>	51
I.2.5.2.1. <u>Résistance de <i>Map</i> à la stérilisation dans le lait</u>	51
I.2.5.2.1.1. <u>Décontamination par application d'une forte pression hydrostatique à température ambiante (Lopez-Pedemonte, T., Sevilla, I., Garrido, J.M. et al. 2006)</u>	52
I.2.5.2.1.2. <u>Décontamination par pasteurisation</u>	52
I.2.5.2.1.2.1. <u>Efficacité et sources de variation de la pasteurisation HTST / UHT (72°C pendant 15 secondes)</u>	53
I.2.5.2.1.2.2. <u>Efficacité et sources de variation de la pasteurisation à basse température (63°C pendant 30 minutes)</u>	54
I.2.5.2.1.2.3. <u>Application particulière au colostrum</u>	54
I.2.5.2.2. <u>Résistance à la décontamination de l'eau</u>	55
II. <u>METHODES DE DIAGNOSTIC ET DE DEPISTAGE DE LA PARATUBERCULOSE</u>	56
II.1. <u>Diagnostic épidémio-clinique</u>	56

II.1.1. <u>Diagnostic différentiel (cas particulier des bovins)</u>	56
II.2. <u>Diagnostic nécropsique</u>	58
II.3. <u>Examens de laboratoire</u>	58
II.3.1. <u>Techniques directes</u>	59
II.3.1.1. <u>Bactérioscopie</u>	59
II.3.1.1.1. <u>Description et mise en œuvre</u>	59
II.3.1.1.2. <u>Caractéristiques</u>	59
II.3.1.2. <u>Histopathologie</u>	60
II.3.1.2.1. <u>Description et mise en œuvre</u>	60
II.3.1.2.2. <u>Caractéristiques</u>	60
II.3.1.3. <u>Culture</u>	60
II.3.1.3.1. <u>Coproculture</u>	61
II.3.1.3.1.1. <u>Description et mise en œuvre</u>	61
II.3.1.3.1.1.1. <u>Procédés de décontamination et milieux de culture</u>	61
II.3.1.3.1.2. <u>Caractéristiques</u>	62
II.3.1.3.1.3. <u>Coproculture de mélange</u>	63
II.3.1.3.1.4. <u>Méthode radiométrique</u>	64
II.3.1.3.2. <u>Culture à partir d'échantillons tissulaires</u>	65
II.3.1.4. <u>Détection par PCR</u>	66
II.3.1.4.1. <u>Intérêt du séquençage génomique de <i>Map</i> dans la méthode PCR</u>	66
II.3.1.4.2. <u>PCR couplée à une migration sur gel d'agarose (IS900, IS<i>mav</i>2)</u>	67
II.3.1.4.2.1. <u>Description et mise en œuvre</u>	67
II.3.1.4.2.2. <u>Caractéristiques</u>	68
II.3.1.4.3. <u>PCR en temps réel (système TaqMan®)</u>	68
II.3.1.4.3.1. <u>Description et mise en œuvre</u>	68

II.3.1.4.3.2. <u>Caractéristiques</u>	69
II.3.1.4.4. <u>PCR multiplexe</u>	69
II.3.2. <u>Techniques indirectes</u>	70
II.3.2.1. <u>Evolution de la réponse immunitaire chez un animal infecté</u>	70
II.3.2.2. <u>Influence de la période péri-partum sur les tests immunologiques</u>	72
II.3.2.3. <u>Mesure de la réponse immunitaire à médiation cellulaire</u>	72
II.3.2.3.1. <u>Test cutané intradermique et test à l'interféron-gamma</u>	72
II.3.2.3.1.1. <u>Description et mise en œuvre</u>	72
II.3.2.3.1.2. <u>Caractéristiques</u>	73
II.3.2.3.1.2.1. <u>IDTc</u>	73
II.3.2.3.1.2.2. <u>TCI et test IFN</u>	73
II.3.2.3.2. <u>Autres tests représentatifs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire</u>	75
II.3.2.4. <u>Mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale</u>	75
II.3.2.4.1. <u>Sérologie : méthode ELISA indirecte</u>	75
II.3.2.4.1.1. <u>Description et mise en œuvre</u>	75
II.3.2.4.1.2. <u>Comparaison des différents tests ELISA ; caractéristiques analytiques</u>	76
II.3.2.4.1.3. <u>Sérologies sur lait (individuel ou de mélange)</u>	80
II.3.2.4.1.3.1. <u>Lait individuel</u>	81
II.3.2.4.1.3.2. <u>Lait de mélange</u>	82
II.3.2.4.2. <u>Sérologie : immunodiffusion en gélose</u>	82
II.3.2.4.3. <u>Sérologie : test de fixation du complément</u>	82
II.3.2.4.4. <u>Test sérologiques : quelles combinaisons possibles ?</u>	83

II.4. Bilan	83
II.4.1. <u>Données pour les bovins</u>	83
II.4.2. <u>Evaluation de ces données pour les ovins et caprins</u>	87
III. MESURES DE LUTTE ET DE PREVENTION CONTRE LA PARATUBERCULOSE EN ELEVAGE BOVIN	89
III.1. <u>Contexte international</u>	90
III.2. <u>Lutte contre la paratuberculose clinique des bovins dans le contexte français</u>	91
III.2.1. <u>Fondements du programme national pour la maîtrise de la paratuberculose en élevage bovin cliniquement infecté</u>	91
III.2.2. <u>Outils diagnostics, déroulement des plans de lutte</u>	92
III.2.3. <u>Critères de sortie du plan de lutte</u>	95
III.3. <u>Intérêts, possibilités et proposition d'un schéma de certification dans le contexte français</u>	96
III.3.1. <u>Les enjeux de la certification (Bonnet, J.N., Gounot, G, Guerin, D. et al. 2002)</u>	96
III.3.1.1. <u>Pour tout éleveur acquéreur</u>	96
III.3.1.2. <u>Pour les filières spécifiques</u>	96
III.3.1.2.1. <u>Vente de bovins reproducteurs</u>	96
III.3.1.2.2. <u>Insémination artificielle et transfert embryonnaire</u>	97
III.3.2. <u>Modèles mathématiques mesurant la faisabilité et l'intérêt économique d'un programme de certification pour la paratuberculose</u>	98
III.3.2.1. <u>Faisabilité et intérêt économique d'un programme de certification vis-à-vis de la paratuberculose dans le contexte français</u>	98
III.3.2.2. <u>Autre modèles mathématiques estimant la faisabilité d'un plan de certification paratuberculose</u>	100

III.4. <u>Propositions de conduite à tenir, améliorations possibles du modèle</u>	101
III.4.1. <u>Propositions concernant le schéma de certification</u>	102
III.4.1.1. <u>Adaptation aux petits ruminants</u>	102
III.4.1.2. <u>Remarques concernant le plan de certification proposé par l'ACERSA</u> ...	102
III.4.1.3. <u>Propositions de conduite à tenir</u>	103
III.4.2. <u>Propositions concernant les plans de lutte</u>	107
III.4.2.1. <u>Possibilités d'utiliser une combinaison de tests de diagnostic</u>	107
III.4.2.1.1. <u>Combinaison de plusieurs tests sérologiques ELISA</u>	107
III.4.2.1.1.1. <u>Comparaison des résultats obtenus avec les différents tests</u>	107
III.4.2.1.1.2. <u>Proposition d'utilisation de l'analyse sérologique combinatoire et résultats observés</u>	109
III.4.2.1.1.3. <u>Intérêts et désavantages de cette méthode</u>	110
III.4.2.1.2. <u>Combinaison de tests directs et indirects</u>	111
III.4.2.2. <u>Lutte contre la paratuberculose dans les élevages avec une forte prévalence</u>	112
III.4.2.2.1. <u>Mesures alternatives à l'élimination des animaux infectés de paratuberculose</u>	113
III.4.2.2.1.1. <u>Traitement médical à visée curative</u>	113
III.4.2.2.1.1.1. <u>Traitement à base d'antibiotiques</u>	113
III.4.2.2.1.1.2. <u>Traitement à base de mycophages</u>	114
III.4.2.2.1.2. <u>Traitement médical à visée préventive: utilisation de la vaccination</u>	115
III.4.2.2.1.2.1. <u>Objectifs de la vaccination</u>	115
III.4.2.2.1.2.2. <u>Limites de la vaccination</u>	116
III.4.2.2.1.2.2.1. <u>liées à l'adjuvant</u>	117
III.4.2.2.1.2.2.2. <u>liées au choix germes vivants vs inactivés</u>	117

III.4.2.2.1.2.2.3. <u>liées aux interférences avec d'autres tests immunologiques</u>	118
III.4.2.2.1.2.3. <u>Conséquences de l'utilisation de la vaccination dans les autres pays</u>	119
III.4.2.3. <u>Lutte contre la paratuberculose dans des élevages où la prévalence est faible</u>	122
III.4.2.3.1. <u>Mesures communes</u>	123
III.4.2.3.1.1. <u>Isolement des animaux suspects</u>	123
III.4.2.3.1.2. <u>Gestion des animaux excréteurs</u>	123
III.4.2.3.1.3. <u>Gestion et traitement des effluents</u>	124
III.4.2.3.1.4. <u>Hygiène des bâtiments</u>	124
III.4.2.3.1.5. <u>Conduite au pâturage</u>	125
III.4.2.3.1.6. <u>Séparation des espèces sensibles</u>	126
III.4.2.3.1.7. <u>Abreuvement</u>	126
III.4.2.3.1.8. <u>Equilibre alimentaire et parasitisme</u>	127
III.4.2.3.1.9. <u>Reproduction</u>	127
III.4.2.3.2. <u>Particularités applicables à l'élevage allaitant</u>	127
III.4.2.3.3. <u>Particularités applicables à l'élevage laitier</u>	128
III.4.2.3.4. <u>Gestion des mouvements d'animaux</u>	129
III.4.2.3.4.1. <u>Précautions lors de l'introduction d'animaux</u>	129
III.4.2.3.4.2. <u>Vente d'animaux</u>	131
CONCLUSION	132
ANNEXE	134
BIBLIOGRAPHIE	141

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

Figure 1 : répartition du nombre de contrôles annuels en France (sources ADILVA 1998 et FNGDSB 2000).....	23
Figure 2 : répartition de la paratuberculose ovine en France	24
Figure 3 : répartition de la paratuberculose caprine en France	26
Figure 4 : agrandissement au microscope électronique montrant un blastocyste bovin avec des germes de <i>Map</i> (flèche) adhérant à la zone pellucide (ZP).....	35
Figure 5 : séquence Dps-like chez <i>M. smegmatis</i> et son homologue chez <i>Map</i>	44
Figure 6 : séquence RelA chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> et RelA-like chez <i>Map</i>	45
Figure 7 : Représentation circulaire de la souche K-10 de <i>Map</i>	66
Figure 8 : représentation des amorces de Millar et Vary sur l'extrémité 5' de <i>IS900</i>	67
Figure 9 : résultat de PCR multiplexe après migration par électrophorèse.....	70
Figure 10 : évolution des deux composantes de la réponse immunitaire et de l'excrétion.....	71
Figure 11 : résultats positifs obtenus avec les diverses méthodes diagnostiques chez les caprins (Goat 1 à 15) (Munjal, S.K. <i>et al.</i> 2007).....	88
Figure 12 : Proposition d'un schéma de certification	104
Figure 13 : proposition d'une méthode de combinaison des tests sérologiques ELISA.....	109

Tableaux :

Tableau 1 : Analyse des facteurs de risque pour les sujets atteints de MC, en comparaison aux sujets sains (Bernstein, C.N. <i>et al.</i> 2007):	21
Tableau 2: principaux facteurs de risque (majeurs et mineurs) de la paratuberculose en élevage.....	37
Tableau 3 : diagnostic différentiel des diarrhées chroniques chez les bovins.....	57
Tableau 4 : caractéristiques et qualités des principaux tests ELISA disponibles.....	77
Tableau 5 : spécificité des 5 tests ELISA comparés.	78
Tableau 6 : sensibilité des 5 tests ELISA comparés pour leur capacité à détecter les animaux excréteurs (test de référence : coproculture)	79
Tableau 7 : Sensibilité du kit ELISA Pourquier pour une utilisation sur lait de mélange	82
Tableau 8 : caractéristiques et qualités des principaux tests utilisés dans le cadre du diagnostic de la paratuberculose	84
Tableau 9 : critères de choix pour la technique de dépistage des animaux excréteurs	92
Tableau 10 : classification des élevages vis-à-vis de la paratuberculose.....	93
Tableau 11 : Plans de dépistage annuels dans le Programme national pour la maîtrise de la paratuberculose en élevage bovin cliniquement infecté.....	94
Tableau 12 : tableau de contingence entre les 3 tests de sérologie ELISA	108
Tableau 13 : Comparaison de différents vaccins contre la paratuberculose	122

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BVD : Diarrhée Virale Bovine

CFU : Colony Formant Unit (unité anglo-saxonne)

D : Temps de réduction décimale, c'est à dire le temps requis pour tuer 90 % des micro-organismes ou des spores (ou bien encore 1 log de concentration) dans un échantillon à une température donnée exprimée en °C ; D s'exprimant en minute.

ELISA : Absorbed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GMQ : Gain Moyen Quotidien

HEY : Herrold's egg yolk = milieu de Herrold

IBR : Rhinotrachéite Infectieuse Bovine

IDTc : intradermotuberculation comparative

IFN : interféron

Johnin-PPD : Johnin-Purified Protein Derivative

LB : Lymphocyte B

LD : Limite de détection

LT : Lymphocyte T

Map : *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*

MC : Maladie de Crohn

Pasteurisation *HTST* ou *UHT* : Pasteurisation *High Temperature – Short Time* ou *Ultra Haute Température*.

Pasteurisation *LTH* : Pasteurisation *Low Temperature Tolding*, à basse température.

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHA : phytohémagglutinine

PPD : Dérivé Protéique Podifié

RFLP : Restriction-Fragment Length Polymorphism

TCI : test cutané intradermique

Test IDT : Test d'intradermoruberculation

Z : augmentation de t°C permettant de diviser D par 10

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Tableau récapitulatif des temps de survie constatés pour <i>Map</i> , souche Bovine, dans différents substrats naturels exposés à des conditions imitant un environnement naturel, ou dans différents modèles de laboratoire.....	134
Annexe 2 : Publications utilisant un modèle bovin pour étudier l'infection à <i>Map</i>	136
Annexe 3 : Publications utilisant un modèle ovin pour étudier l'infection à <i>Map</i>	137
Annexe 4 : Publications utilisant un modèle caprin pour étudier l'infection à <i>Map</i>	139
Annexe 5 : Publications utilisant un modèle de ruminant sauvage pour étudier l'infection à <i>Map</i>	140

INTRODUCTION

La paratuberculose, désignée comme la maladie de Johne, ou bien encore entérite chronique hypertrophiante, est une maladie enzootique contagieuse due à une mycobactérie : *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Map).

L'évolution clinique se caractérise par sa chronicité sur le plan individuel : une entérite granulomateuse, provoquant une diarrhée incoercible cachectisante malgré un appétit conservé, et se terminant inéluctablement par la mort.

L'entérite, caractérisée d'un point de vue macroscopique par l'épaississement de la muqueuse, est associée à une malabsorption des protéines et des nutriments essentiels, puis au stade terminal, à des pertes protéiques majeures ; les mycobactéries peuvent être excrétées pendant de longues périodes (de 1 à 5 ans), avant même l'apparition des signes cliniques.

En 1826, D'Aroval (Cottureau P., 1970) rapporta une forme particulière d'entérite associée à une diarrhée chronique chez les bovins ; puis en 1881, Hansen et Nielsen notèrent, sur des bovins morts à la suite de diarrhée chronique, un épaississement de la muqueuse intestinale qui n'avait jamais été décrit jusqu'alors.

C'est en 1895, que deux scientifiques allemands, H.A. Johne et L. Frothingham firent une description clinique et nécropsique de la maladie ; ils isolèrent un bacille acido-alcool résistant à la coloration de Ziehl-Nielsen, à partir de bovins atteints de diarrhée cachectisante. Cette diarrhée chronique était associée à une inflammation granulomateuse de l'iléon. Le bacille fut tout d'abord nommé *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*.

Malgré plusieurs tentatives de culture, Bang en 1905 ne parvient pas à reproduire la tuberculose en inoculant le bacille issu de bovin en phase de diarrhée cachectisante à des animaux de laboratoire : il parle alors de « paratuberculose ».

En 1910, il prépare une tuberculine aviaire qui, injectée à des bovins malades, provoque une réaction identique à la tuberculine bovine chez des bovins tuberculeux.

Cette même année, Trowt F.W. a vérifié le postulat de Koch en cultivant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en laboratoire, en reproduisant la maladie et en infectant du bétail expérimentalement.

Par la suite, les nomenclatures choisies seront *Mycobacterium johnei*, puis *Mycobacterium paratuberculosis* ; la plus récente et actuellement en cours est *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, en 1990.

Depuis 2001, la paratuberculose est considérée par l' Office International des Epizooties comme une maladie d'importance globale majeure ; elle est classée dans la liste B des maladies transmissibles (et donc considérée comme une maladie transmissible ayant une

importance socio-économique et/ou de santé publique pour les animaux de compagnies et de production) ; cette maladie est décrite sur tous les continents, où elle affecte communément les ruminants domestiques, mais également de nombreuses espèces sauvages.

La forme clinique est à l'origine de pertes économiques très significatives en élevage, avec des chutes de la production laitière (la diminution annuelle peut-être estimée à 15-25% pour une vache, notamment si les signes cliniques apparaissent juste après le vêlage, ce qui est assez fréquent.) ainsi qu'un abattage précoce des animaux, la diminution de l'état corporel chez les vaches allaitantes atteintes de paratuberculose sub-clinique n'ayant pas été parfaitement documentée.

Ainsi, aux Etats-Unis, les pertes économiques associées à la paratuberculose pour l'industrie bovine ont été estimées à 200 millions de dollars chaque année.

Mais la paratuberculose soulève aussi d'autres questions : bien que non répertorié parmi les agents zoonotiques, *Map* est suspecté d'être un des agents responsables de la Maladie de Crohn chez l'homme, maladie affectant environ 5 personnes sur 100 000 dans les pays développés. La lutte contre la paratuberculose pourrait donc avoir un enjeu économique et sanitaire majeur.

Le but de ce travail est de rassembler les données bibliographiques concernant l'épidémiologie de la paratuberculose des ruminants domestiques, ainsi que les méthodes diagnostiques permettant de mettre en évidence l'infection, principalement au laboratoire. A partir de ces données, nous évaluerons et ferons la synthèse des mesures de contrôle et de prévention à proposer dans les élevages bovins en France.

I. EPIDEMIOLOGIE DE LA PARATUBERCULOSE

I.1. Epidémiologie descriptive

I.1.1. Espèces cibles

I.1.1.1. Animales

I.1.1.1.1. Ruminants et pseudo-ruminants

La paratuberculose clinique à *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*) est très fréquemment recensée chez les ruminants domestiques : bovins (de races laitière ou allaitante), ovins (là aussi de races laitière ou allaitante), caprins, ainsi que chez les cerfs d'élevage. La paratuberculose a été décrite pour la première fois en France chez des moutons en 1935 par Thierry et Getas, et chez des chèvres par Cotterreau et Poulenard en 1964.

En outre, la forme clinique est également décrite chez les ruminants et pseudo-ruminants sauvages : c'est notamment le cas chez le cerf (*Cervus elaphus*), (Chiodini, R. J. *et al.* 1983), le chevreuil (*Capreolus capreolus*) (Robino, P. *et al.* 2002), le bison (*Bison Bison*) (Buergelt, C.D. *et al.* 2000) ainsi que chez l'élan (*Alces alces*) (Manning, E.J.B *et al.* 2003) de manière courante.

On peut considérer que *Map* a été mis en évidence chez un large éventail d'espèces (lama, buffle, yack ou bien encore chez le chameau) représentant pratiquement l'ensemble des espèces de pseudo-ruminants et de ruminants, exception faite des girafes (Manning, E.J. 2001).

De plus, chez les espèces de ruminants sauvages, il est à noter que les lésions majeures et les signes cliniques décrits sont identiques à ceux observés chez les bovins ou les ovins domestiques ; l'infection est pour elles aussi, létale à plus ou moins long terme (Williams, E.S. *et al.* 1979 ; Buergelt, C.D. *et al.* 2001b).

Map est caractérisé par l'existence de 2 souches dont les phénotypes sont différents. Elles sont désignées comme la souche *ovine* d'une part, la souche *bovine* d'autre part, car ces souches sont caractérisées par une certaine spécificité d'hôte, mais également un caractère pathogène différent. Elles ont des propriétés culturales différentes, les souches ovines étant très difficiles à isoler.

Bien que les bovins soient réceptifs aux deux souches, ils sont moins souvent infectés par la souche ovine. Au contraire, les ovins sont infectés dans la plupart des cas par une souche ovine. Les caprins contractent le plus souvent la souche bovine, plus rarement la souche ovine.

D'un point de vue du génome, la souche ovine possède de larges délétions par rapport à la souche bovine (Marsh, I.B. *et al.* 2006). Toutefois, et contrairement aux hypothèses antérieures, la souche ovine n'est pas un intermédiaire entre *Mycobacterium avium subsp. avium* et *Map* (lien phylogénétique restant à définir).

En outre, à l'heure actuelle, la présence ou non de certaines séquences génétiques ne permet pas d'expliquer totalement les différences phénotypiques observées.

I.1.1.1.2. Non – ruminants

I.1.1.1.2.1. Espèces sauvages répertoriées

Parmi les autres espèces de non-ruminants côtoyant des ruminants d'élevage, la présence de *Map* a pu être démontrée chez plusieurs espèces ; au premier plan épidémiologique se situe le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) et le lièvre (*Lepus europaeus*), ainsi que leurs prédateurs naturels (notamment les renards (*Vulpes vulpes*), hermines (*Mustela erminea*) (Beard, P.M. *et al.* 2000), belettes (*Mustela nivalis*) et blaireaux (*Meles meles*)). Nous verrons pour quelles raisons ultérieurement.

Map fut également isolé à partir de prélèvements tissulaires réalisés chez des rongeurs (mulots communs (*Apodemus sylvaticus*) et rats surmulot (*Rattus norvegicus*), d'oiseaux tels que le choucas des tours (*Corvus monedula*), la corneille noire (*Corvus corone*) ou le corbeau freux (*Corvus frugilegus*) ; il l'a également été chez des primates (mandrills (*Papio sphinx*) (Zwick, L.S. *et al.* 2002) et macaques (*Macaca arctoides*) (Mc Clure, H.M *et al.* 1987)).

I.1.1.1.2.2. Implications épidémiologiques

Bien que le caractère pathogène du bacille sur toutes ces espèces demeure une question ouverte, certaines lésions histologiques ont déjà été répertoriées chez des lapins, renards, hermines et corbeaux en Ecosse (Greig, A. *et al.* 1999).

De plus, puisque le bacille a été mis évidence chez ces espèces à partir d'échantillons fécaux et tissulaires (Corn, J.L. *et al.* 2005) ; ces espèces animales doivent être considérées comme potentiellement infectées, et non pas comme de simples vecteurs passifs à la suite de l'ingestion de matériel contaminant.

Toutefois, dans les conditions expérimentales, l'infection d'espèces monogastriques par l'inoculation de grandes quantités de bacilles n'entraîne pas l'apparition de signes cliniques, ni de mortalité. Il faut toutefois souligner la difficulté à reproduire la maladie chez les ruminants.

L'implication de possibles réservoirs sauvages de *Map* dans le cycle de transmission de la paratuberculose, et leur importance ne sont pas clairement établis à ce jour. Il n'existe encore que peu de travaux ayant étudié leur rôle dans l'épidémiologie de cette maladie.

En effet, leur rôle exact est difficile à définir, d'une part à cause de la très longue période d'incubation, et d'autre part à cause de la difficulté à distinguer celles-là, parmi toutes les autres sources potentielles d'infection.

Cependant, il semble indispensable dans l'avenir d'éclaircir ce point, car les ruminants domestiques sont fréquemment en contact avec la faune sauvage et/ou leurs fèces, notamment au pâturage, ou par la consommation d'aliments et d'eau contaminés par des matières fécales, permettant la contamination inter-espèces.

Dans cette hypothèse, la présence d'un réservoir sauvage ayant la capacité de transmettre l'infection aux animaux domestiques pourrait altérer le succès des programmes de contrôle de la paratuberculose. Alors que la fréquence de transmission de l'infection à des

animaux domestiques par la faune sauvage n'a pas été documentée à ce jour, plusieurs travaux suggèrent que les animaux sauvages peuvent être infectés à partir des animaux domestiques (Greig, A. *et al.* 1999).

Ces transmissions inter-spécifiques ont été étudiées par Motiwala. (Motiwala A.S. *et al.* 2004). En analysant les isolats obtenus à partir de 33 espèces animales, au total 8 souches de *Map* ont pu être différenciées par des techniques d'analyse moléculaire, indiquant une grande fréquence de transmission entre ces espèces.

Lors d'une étude menée dans des fermes d'élevage bovin du Wisconsin et de Géorgie (U.S.A.), la prévalence d'animaux (mammifères et oiseaux) infectés (identifiés par isolement à partir de fèces ou d'organe, puis confirmés par PCR *IS900*) oscillait entre 0 et 8,3% ; une excrétion de bacilles fut mise en évidence chez 0,9% des animaux (Corn, J.L. *et al.* 2005) ; au cours de cette étude, aucune corrélation n'a été établie entre la prévalence de l'infection chez les espèces domestiques et celle chez les espèces sauvages.

En considérant le faible pourcentage d'animaux excréteurs parmi les espèces sauvages, la contamination environnementale des pâtures par la faune sauvage semble négligeable en comparaison de la quantité de germes disséminés par les ruminants domestiques infectés (étant donné le nombre d'animaux infectés, la densité animale en élevage et le volume de fèces contaminants produit par un ruminant infecté).

Néanmoins, cette source potentielle pourrait avoir une signification épidémiologique pour des élevages où *Map* était présent et a été éliminé avec succès, ou bien encore dans des fermes indemnes, localisées dans une zone où des ruminants infectés sont présents. Dans ces situations, les espèces sauvages pourraient avoir un rôle de réservoir, ou bien de vecteur de l'infection entre les cheptels.

I.1.1.1.2.3. Voies de contamination des non-ruminants

Chez les rongeurs granivores ou omnivores, l'isolement de *Map* semble pouvoir être relié à leur présence dans des lieux où des bovins infectés sont présents (locaux d'élevage, abattoirs et équarissages), plutôt que par le biais d'une contamination environnementale (Beard, P.M. *et al.* 2001). En effet, l'isolement de *Map* a été possible à partir de rongeurs capturés dans des locaux d'abattage, tandis que pour ceux capturés à proximité du bétail, ou sur des pâtures contaminées, l'isolement fut négatif.

Pour les carnivores, tels que les renards, hermines, ou bien encore certains corvidés, la contamination est très certainement liée à la consommation de proies elles-mêmes infectées. En effet, ces carnivores consomment rongeurs et lagomorphes en totalité, ce qui permet l'ingestion de tissu intestinal ou lymphoïde potentiellement infecté par *Map*.

I.1.1.1.2.4. Cas particulier du lapin (*Oryctolagus cuniculus*)

I.1.1.1.2.4.1. Isolement de *Map* chez des lagomorphes

Historiquement, le premier isolement de *Map* chez un lagomorphe naturellement infecté a été réalisé chez un lièvre (*Lepus europaeus*) en Angleterre (Matthews, P.R.J. *et al.* 1977), bien que le bacille n'ait pas été complètement caractérisé.

Des lésions attribuées à la paratuberculose furent plus tard documentées en Ecosse, chez un lapin sauvage (*Oryctolagus cuniculus*) (Angus, K., 1990).

Plus récemment, la présence de *Map* fut confirmée par PCR *IS900* et par examen histopathologique lors de plusieurs études réalisées sur des lapins provenant de fermes situées à l'Est de l'Ecosse où la paratuberculose était endémique (Greig, A. *et al.* 1997 ; Greig, A. *et al.* 1999 ; Beard, P.M. *et al.* 2001b).

Concernant les lésions histopathologiques observées, une étude décrit une paroi intestinale épaissie, et une augmentation de la taille des nœuds lymphatiques régionaux chez trois lapins examinés (Greig, A. *et al.* 1997). Ces lésions ressemblent à celles observées chez les ruminants infectés.

I.1.1.1.2.4.2. Contamination entre espèces

La possibilité d'une transmission entre ces espèces (plus particulièrement entre les bovins et les lagomorphes) fut démontrée par infection expérimentale : des lapins ont été infectés à l'aide d'une souche bovine de *Map*. (Mokresh, A.H. *et al.* 1990).

De même, des veaux ont pu être infectés expérimentalement par une souche de *Map* qui avait été isolée chez des lapins sauvages (Beard, P.M. *et al.* 2001). L'hypothèse d'une transmission entre ces espèces est donc confirmée.

Les travaux de Greig *et al.* publiés en 1999 confirment cette possibilité, dans les conditions naturelles cette fois (Greig, A. *et al.* 1999) : sur la base d'un typage morphologique et génétique, il n'a pas été possible de distinguer les souches de *Map* isolées à partir des bovins ou des lapins, d'une même zone géographique, ce qui renforce l'idée d'une transmission fréquente entre ces espèces.

I.1.1.1.2.4.3. Rôle épidémiologique du lapin

Etant donné qu'un ruminant en phase clinique de paratuberculose excrète plus de 10^8 bacilles par gramme de fèces (Whittington, R.J. *et al.* 2000), il est très probable que les herbivores sauvages (tels que les lagomorphes) partageant des pâtures avec des ruminants domestiques infectés, absorbent des bacilles au moment où ils ingèrent des végétaux souillés ; ils peuvent donc être assez facilement contaminés.

Concernant la contamination des pâtures par les fèces de lagomorphes, elle a été estimée dans quatre fermes écossaises (Hutchings M.R. *et al.* 2002) à plus de 7000 pelotes fécales par hectare et par jour.

Le comportement alimentaire des ruminants est tel qu'ils évitent de pâturer dans les zones où se trouvent des déjections de carnivores (Hutchings, M.R. *et al.* 1997), ou leurs propres déjections (Bao, J. *et al.* 1998).

A l'inverse, les ruminants ne présentent aucune répugnance significative vis-à-vis des zones comportant des déjections de lapins, quelle que soit la concentration de matières fécales (Daniels, M.J. *et al.* 2001), ou le chargement en bovins ; il n'existe de plus aucun indice indiquant que les bovins soient capables de détecter les pelotes fécales de lagomorphes.

Ces informations suggèrent donc que les ruminants qui pâturent dans des parcelles où des lagomorphes sont présents, ont une grande probabilité de consommer de l'herbe contaminée.

De ce fait, les lagomorphes ont probablement une importance épidémiologique supérieure à celle des carnivores (ainsi qu'à celle des corvidés, au comportement alimentaire de charognard) dans la dissémination de *Map*.

L'existence d'une transmission entre lagomorphes a également été documentée. S'appuyant sur les différents modes de contamination connus chez les ruminants domestiques, il a été montré que la contamination pouvait se faire de façon horizontale (voie oro-fécale), pseudo-verticale (via le lait, les contaminations fécales) et verticale (voie trans-placentaire) (Judge, J. *et al.* 2006).

Concernant la transmission verticale, et contrairement aux bovins chez qui la placentation est syndesmochoriale, les lagomorphes ont une placentation hémendothéliale, où l'endothélium des capillaires chorioniques est en contact direct avec le sang maternel ; la transmission transplacentaire pourrait donc être supérieure à celle observée chez les ruminants.

Ainsi, non seulement les lagomorphes constituent un réservoir de bacilles, mais l'infection peut en plus persister au sein de cette espèce, indépendamment des espèces de ruminants.

Des lapins atteints de paratuberculose clinique pouvant excréter plus de 4×10^6 UFC par gramme de fèces (Hutchings, M.R. *et al.* 1997), une seule pelote fécale contient donc en théorie suffisamment de mycobactéries pour contaminer un ruminant sensible.

Il a donc été conclu que les ruminants domestiques peuvent s'infecter par l'ingestion d'herbe contaminée par des lapins infectés de paratuberculose.

Même si les déjections fraîches n'étaient pas ingérées directement par les ruminants, cela permet une contamination du sol, de l'eau après la décomposition des pelotes.

Le grand nombre d'espèces qui peut être infecté par *Map* d'une part, et leur appartenance à des groupes phylogénétiques très divers (lagomorphes, canidés, mustélinés, corvidés, muridés) d'autre part, incite à s'interroger sur le caractère zoonotique de la paratuberculose, et ce d'autant plus que des espèces de primates peuvent être infectées.

I.1.1.2. Existe-t-il un lien avec la maladie de Crohn ?

La maladie de Crohn (MC) est une affection chez l'homme, qui est caractérisée par une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal ; outre un mal-être général, les patients montrent des douleurs abdominales, un amaigrissement et une diarrhée chronique. Bien que l'iléon distal soit la portion la plus souvent atteinte, la maladie de Crohn peut affecter toutes les portions du tractus digestif.

Au Royaume-Uni, la prévalence de la maladie était de 13 cas sur 100 000 personnes en 2001, avec 3000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Elle affecte typiquement les

personnes âgées de 16 à 25 ans, bien qu'elle puisse se déclarer dans l'enfance ou plus tard à l'âge adulte.

Une mutation du gène *NOD2/CARD15*, située sur le chromosome 16, semble prédisposer à la maladie de Crohn.

La protéine *NOD2* est un récepteur responsable de la reconnaissance des peptidoglycanes bactériens, et donc notamment des mycobactéries ; ainsi, une activité altérée de ce récepteur (notamment suite à une mutation génétique du gène *NOD2*) engendre une détérioration de la réponse immunitaire contre les mycobactéries, et facilite leur incorporation intracellulaire. La sensibilité aux infections bactériennes intestinales, notamment intracellulaires, est alors augmentée. La proportion de cas attribuée à une mutation de ce gène, est comprise entre 15 et 25%, ce qui suggère l'existence d'autres facteurs causals importants (Newman, B. *et al.* 2003).

Bien que d'importance supposée moindre, d'autres variations génétiques, présentes sur divers gènes, semblent également prédisposer à la MC.

Toutefois, il faut là aussi noter que la proportion des cas attribuée à l'ensemble des allèles connus, qui entraînent une sensibilité accrue à la MC, reste inférieure à 30% (Hampe, J. *et al.* 2007).

Nous pouvons ici dresser une liste non exhaustive des gènes identifiés :

- *DLG5* (Stoll, M. *et al.* 2004)
- *ABCBI*, aussi connu comme *MDR1* (Brant, S.R *et al.* 2003)
- *CARD 4*, aussi connu comme *NOD1* (Mc Govern, D.P. *et al.* 2005)
- *TNFSF15* (Yamazaki, K. *et al.* 2005)
- ***IL23R*** (Duerr, R.H. *et al.* 2006)
- *PHOX2B*, *NCF4* et *FAM92B* (Rioux, J.D. *et al.* 2007)
- ***ATG16L1*** (Hampe, J. *et al.* 2007 ; Rioux, J.D. *et al.* 2007) ; situé sur le chromosome 2, il code pour une protéine exprimée dans les cellules épithéliales intestinales. Il appartient à une famille de gènes impliquée dans l'autophagie, en régulant la dégradation protéique dans les lysosomes, la présentation antigénique, l'organisation des messages entre cellules et autres étapes essentielles à l'initiation et à la régulation de la réponse inflammatoire.
- ***IRGM*** (gène permettant d'induire l'autophagie, et notamment le contrôle de *Mycobacterium tuberculosis* au sein des macrophages humains), situé sur le chromosome 5, *NKX2-3* et *PTPN2* (Parkes, M. *et al.* 2007).

Il est important de souligner que les mutations des gènes considérés comme les plus importants en terme de risque pour la MC (en gras dans le texte, principalement *NOD2*, *IL23R*, *ATG16L1* et *IRGM*), engendrent chez l'hôte une altération de la réponse immunitaire précoce. Cela renforce l'hypothèse selon laquelle la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle majeur dans l'établissement de la Maladie de Crohn.

Ainsi, la maladie de Crohn est considérée comme une affection dont l'étiologie est complexe et multifactorielle, associant des facteurs de prédisposition génétique, et des facteurs environnementaux (agents infectieux, facteurs alimentaires ou tabagisme), ainsi que des anomalies de la réponse inflammatoire.

Comme nous l'avons vu précédemment, *Map* possède un pouvoir infectieux et pathogène chez de très nombreuses espèces animales, notamment des primates non-humains. D'autre part, il ne faut pas négliger le fait que plusieurs autres mycobactéries pathogènes (notamment *Mycobacterium bovis*, agent de la tuberculose) sont des zoonoses avérées.

L'association possible entre *Map* et la maladie de Crohn a été suggérée pour la première fois en 1913, sur la base des similitudes cliniques, lésionnelles et épidémiologiques.

De nombreux éléments viennent étayer la possible implication de *Map* dans la maladie de Crohn :

- Chez des patients atteints de la maladie de Crohn, l'ADN de *Map* a été détecté dans plus de 90% des cas par PCR, dans 70% des cas par hybridation in-situ (Sechi, L.A. *et al.* 2001) et l'ARN de *Map* a été mis en évidence par RT-PCR dans 100% des cas d'une autre étude (Mishina, D. *et al.* 1996).
- *Map* a été isolé à partir de lait humain (Naser, S.A. *et al.* 2000), de fèces, de tissu intestinal et de sang périphérique chez des patients atteints de maladie de Crohn.
- Les tests sérologiques spécifiques de *Map* (méthode ELISA) sont plus souvent positifs, de manière significative, chez les patients atteints de la maladie de Crohn que chez les individus contrôle (Collins, M.T. *et al.* 2000b). Mais cela n'a été démontré que par une seule étude.
- De plus, une antibiothérapie ciblant les bacilles de *Map* (association de rifabutine, clarithromycine et clofazimine pendant une durée de 17 à 54 mois) chez des patients atteints de la maladie de Crohn a permis une diminution des signes cliniques associés à la maladie chez de nombreux patients, voire la rémission de celle-ci (sans toutefois empêcher les rechutes).

Toutefois, il est très important de souligner que le rôle de *Map* dans l'étiologie de la MC est fortement controversé. Est-il l'un des agents causals de ce syndrome, ou bien est-ce qu'une affection non encore identifiée permettrait à *Map* d'infecter l'intestin de façon secondaire, et provoquerait entre autres les bactériémies détectées ?

Certaines études contestent ainsi l'importance étiologique de *Map* dans la maladie de Crohn.

C'est notamment le cas de l'étude réalisée par Bernstein *et al.*, qui travaille sur les interactions entre le statut *NOD-2* et la réponse sérologique contre *Map*, dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin, dont fait partie la MC (Bernstein, C.N. *et al.* 2007).

Les données ont été obtenues à partir de 182 patients atteints de la maladie de Crohn, 105 patients atteints de colite ulcéraire, et 295 personnes en bonne santé. Pour chaque individu, le génotype *NOD-2*, ainsi qu'une sérologie indirecte pour *Map* ont été réalisés.

37 % des patients atteints de MD ont une ou plusieurs mutations sur le gène *NOD-2* (contre 14 % parmi le groupe contrôle, $P < 0,001$) ; les hétérozygotes pour la(les) mutation(s)

ont un risque trois fois plus élevé de déclarer une MC, les homozygotes (double-mutant) pour ces mutations ont un risque 30 fois plus élevé.

Une mutation sur le gène *NOD-2* prédisposerait effectivement à la MC.

Parmi cette même population, la séroprévalence pour *Map* était de 35%, sans aucune différence significative parmi les patients atteints de MC, de colite ulcéreuse ou parmi les contrôles.

En outre, aucune interaction n'a été mise en évidence entre une (ou plusieurs) mutation(s) concernant *NOD-2* et le statut sérologique pour *Map*.

En conclusion de cette étude, il n'a été mis en évidence aucune interaction entre le génotype *NOD-2* et le statut sérologique pour *Map*, en relation avec la maladie de Crohn, ni entre *Map* et la maladie de Crohn. Toutefois, cette étude ne rejette pas totalement le lien entre *Map* et la MC, mais relativise l'importance donnée (en terme de facteur de risque) à cette interaction.

Les facteurs de risque retenus par les auteurs pour la MC sont une ou plusieurs mutations sur le gène *NOD-2*, le fait d'avoir fumé (même occasionnellement), ainsi que l'existence d'un historique familial concernant les entérites inflammatoires.

Tableau 1 : Analyse des facteurs de risque pour les sujets atteints de MC, en comparaison aux sujets sains (Bernstein, C.N. *et al.* 2007) :

Facteur de risque	Odd-Ratio	<i>P</i> value	Intervalle de confiance à 95%
Porteur de mutation NOD-2 (oui vs. non)	3,52	<0,001	2,19 – 5,66
Sérologie <i>Map</i> (séropositif vs. séronégatif)	1,08	0,74	0,69 – 1,66
Fumeur (déjà vs. jamais)	1,99	0,001	1,30 – 3,02
Historique familial de maladie inflammatoire intestinale	2,27	0,01	1,20 – 4,28

Dans l'hypothèse où *Map* aurait un lien avec la MC, quelles sont les voies de contamination ?

- Des bacilles de *Map* viables peuvent être excrétés dans le lait, alors que l'efficacité de la pasteurisation en routine est mise en doute (cet aspect sera abordé ultérieurement) ; de plus, de nombreux fromages sont fabriqués à partir de lait, de brebis ou de vache, non pasteurisé
- La présence de *Map* a été détectée dans l'eau potable de plusieurs réseaux d'adduction municipaux (Mishina, D. *et al.* 1996) ; il est résistant aux traitements chlorés usuels.

- Les autres voies de contamination plausibles sont la viande de ruminants insuffisamment cuite, infectés par *Map*, ou souillée par des matières fécales infectieuses à l'abattoir.

Ainsi, à l'heure actuelle, les avis scientifiques sont partagés ; de toutes évidences, les données disponibles ne suffisent pas à prouver, ou bien à réfuter définitivement, l'hypothèse selon laquelle *Map* est en partie responsable de la maladie de Crohn, mais elle demeure possible et vraisemblable.

En des termes plus neutres, nous pouvons, à l'heure actuelle, dire que dans certains cas *Map* est associé à la maladie de Crohn chez l'homme, sans toutefois indiquer tout lien de causalité. Mais quelle que soit la ou les étiologies qui seront indentifiées, les bactériémies à *Map* détectées doivent être traitées dans ces cas, et évitées dans tous les cas.

Cette possibilité renforce d'autant la nécessité de contrôler la paratuberculose chez les ruminants. En l'absence de maîtrise l'enjeu économique et sanitaire pourrait être majeur dans les prochaines années.

I.1.2. Répartition de la paratuberculose

Quel que soit le pays concerné, la paratuberculose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire, les données épidémiologiques disponibles ne sont donc que parcellaires.

I.1.2.1. Répartition dans l'espace

La répartition géographique de la paratuberculose n'est pas connue de manière précise, ni son importance réelle dans les zones endémiques. Et ce sans même tenir compte des différences entre prévalence réelle et apparente, en raison des techniques de dépistage, ou de diagnostic, qui se révèlent très imparfaites.

I.1.2.1.1. A l'échelle mondiale

La paratuberculose est présente sur tous les continents, mais semble concerner plus particulièrement l'Europe (dans la partie septentrionale du continent, c'est-à-dire la Grande-Bretagne, les Pays-Bas (53 % des cheptels bovins sont considérés séropositifs, avec 2,6% des bovins (Van Schaik, S.J. *et al.* 2003)), la Belgique, les pays scandinaves et la France) et l'Amérique du Nord (21, 6% des cheptels bovins considérés séropositifs, avec 3,4% des bovins (Wells, S.J. *et al.* 2000)) .

Par exemple en Inde, l'incidence de la paratuberculose est estimée comme variant entre 2 et 18%.

Dans d'autres pays européens tels que la Suisse, la prévalence est inférieure à 0,1%.

La paratuberculose ovine est également présente en Nouvelle-Zélande, mais aussi en Australie (premier cas diagnostiqué en 1980) ; elle continue de s'y propager très rapidement malgré les mesures de lutte qui ont été instaurées.

La prévalence de cette affection est très variable selon les pays, et très probablement largement sous-estimée (manque d'enquêtes à grande échelle, méthodes de diagnostic et de dépistages employés, volonté de dissimuler la présence de cette affection à des fins commerciales).

I.1.2.1.2. A l'échelle de la France

Historiquement, le cantonnement à certains bassins de production était expliqué par la nature des sols (acide), la gestion des élevages, et peut-être certaines prédispositions génétiques.

Actuellement, la maladie peut-être considérée comme relativement ubiquiste, même si sa fréquence varie d'une zone géographique à l'autre.

I.1.2.1.2.1. Répartition de la paratuberculose des bovins en France

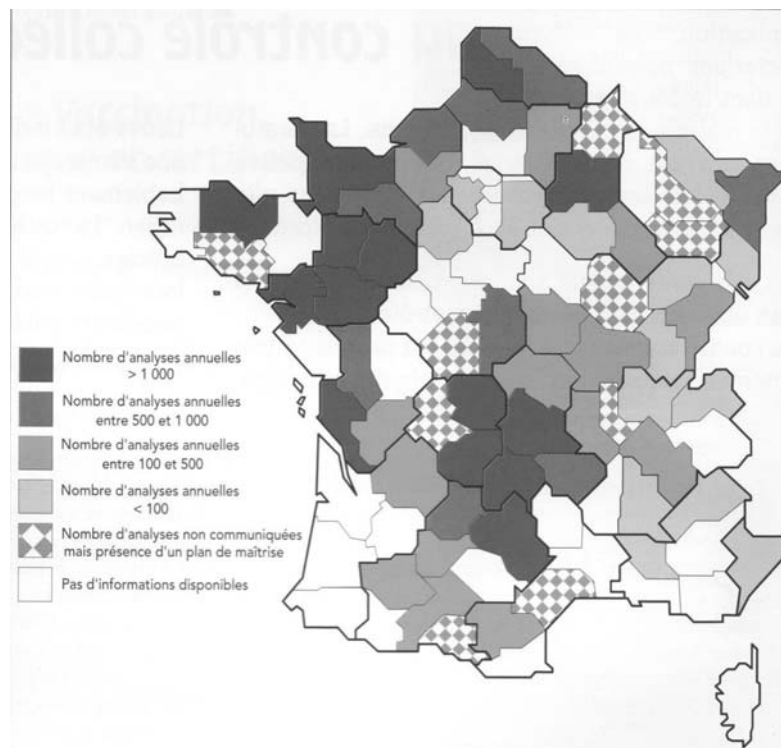


Figure 1 : répartition du nombre de contrôles annuels en France (sources ADILVA 1998 et FNGDSB 2000)

En France (Données recueillies en 2002 ; Figure 1 ; Vialard, J. 2002) les zones où la paratuberculose bovine est la plus fréquente sont la Bretagne, la Normandie et le Massif Central, qui sont des foyers historiques de la paratuberculose en France, ainsi que les Pays de Loire, la région Rhône-alpes et le quart Sud-ouest de la France.

La paratuberculose est considérée comme préoccupante dans 60% des départements.

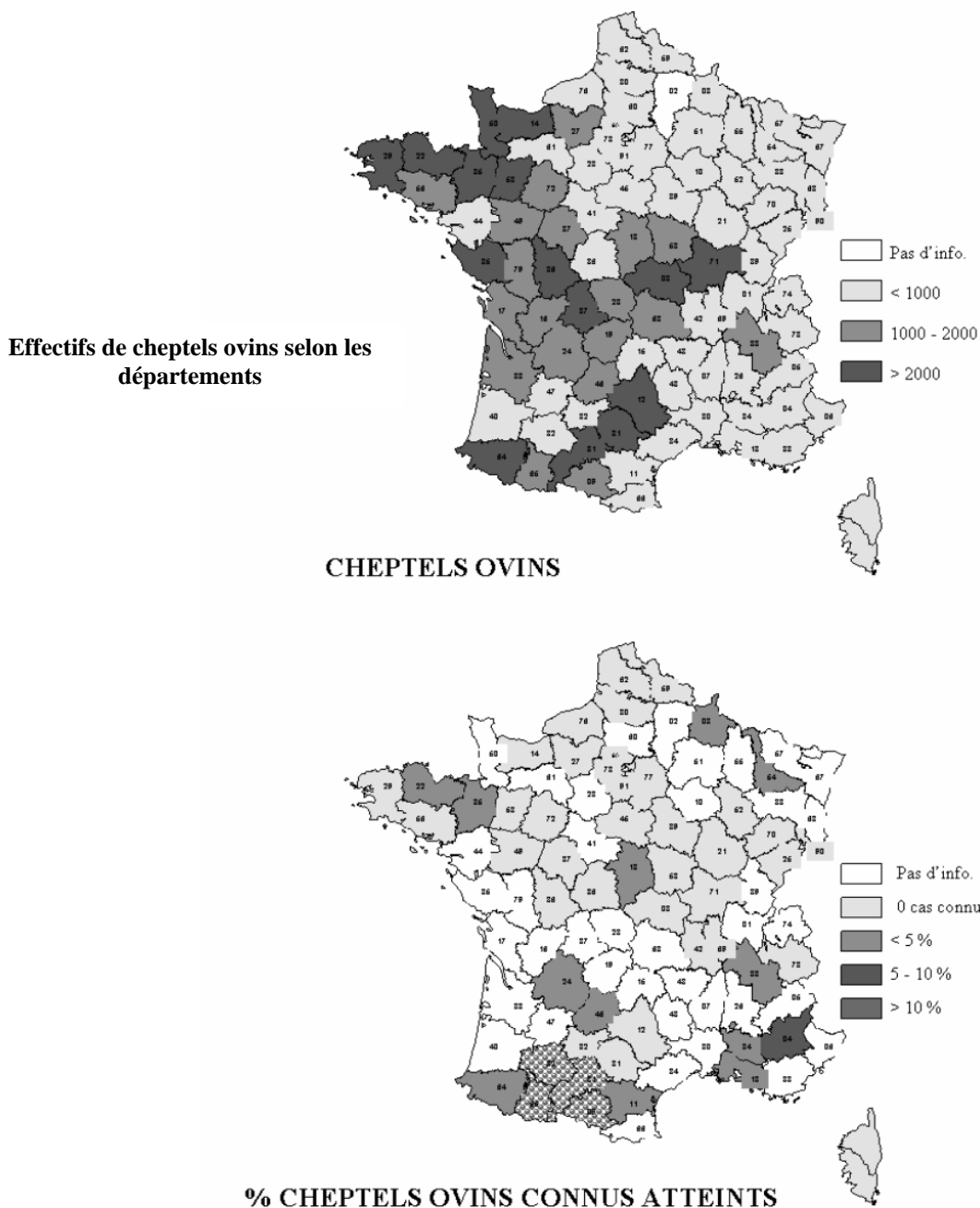
En 2001, d'un point de vue global, la proportion de troupeaux atteints varie de 0,02 à 4,5% selon les départements ; ces chiffres étant très probablement en progression (Repiquet, D., 2001). Selon les mêmes sources, au niveau individuel, 2,5% des bovins français (tant allaitants que laitiers) seraient excréteurs.

I.1.2.1.2.2. Répartition de la paratuberculose des petits ruminants en France

La répartition française de la paratuberculose chez les petits ruminants est plus confidentielle encore ; elle a fait l'objet d'une enquête FNGDS en octobre 2004 (PETIT, H. 2006).

Les cartes de répartition, chez les ovins et chez les caprins, sont respectivement présentées aux Figures 2 et 3.

Figure 2 : répartition de la paratuberculose ovine en France

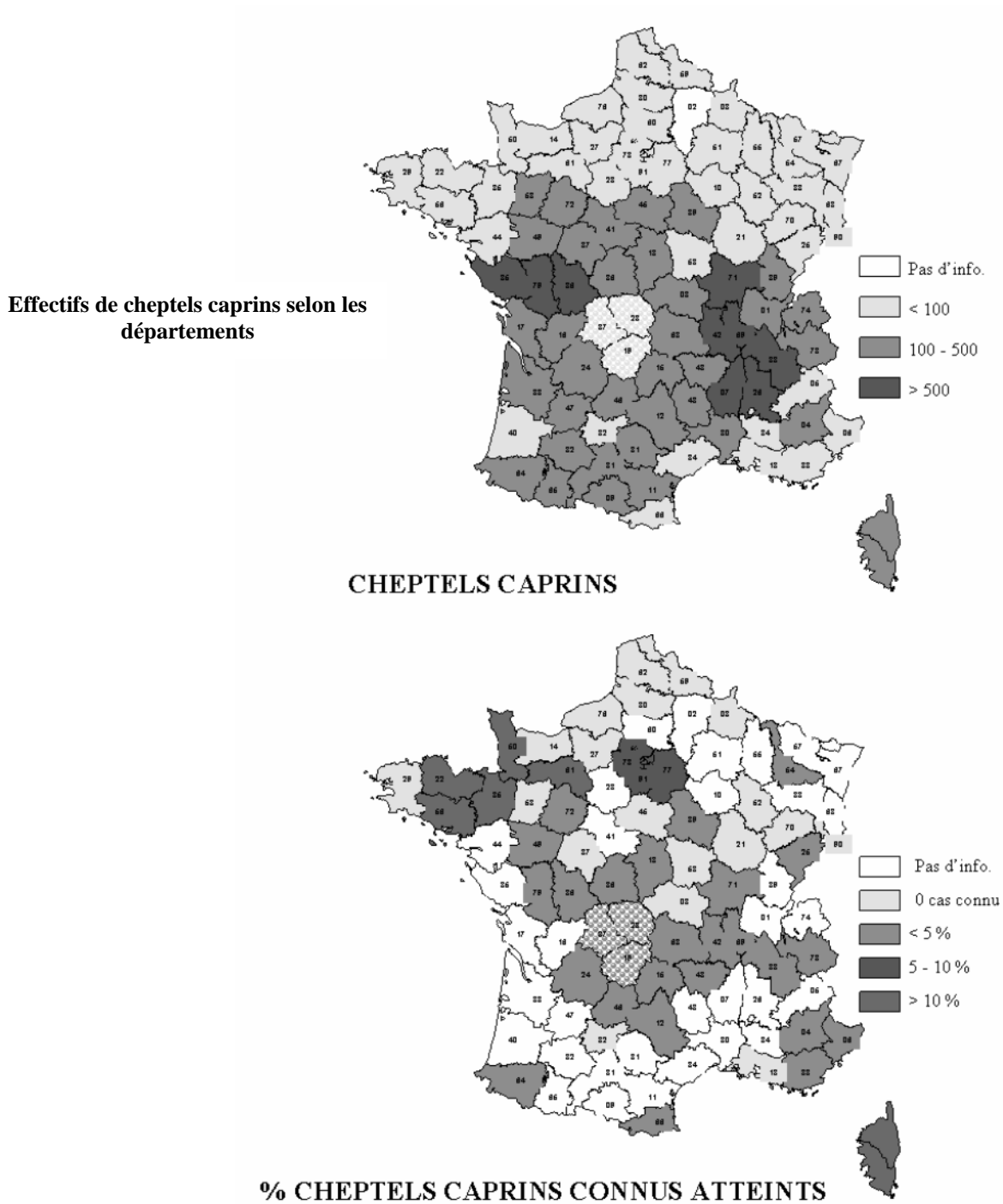


Lors de cette enquête, 43 % des départements déclarent n'avoir aucune information sur la paratuberculose chez les ovins ; il en est à peu près de même chez les caprins (37% des départements ne peuvent pas fournir d'information), les autres affirmant l'aspect incomplet de leurs connaissances.

Pour l'espèce ovine, selon la répartition des cas connus, la maladie ne semble pas prépondérante au nord d'une ligne Bordeaux-Lyon. En revanche, la plupart des départements du sud susceptibles d'avoir des informations y sont confrontés, avec des taux qui dépassent parfois 10% des cheptels.

En croisant cette carte avec celle des effectifs ovins (les principales régions de production ovine étant situées dans le grand Ouest, le Centre et le Sud-Ouest), un impact économique majeur est probable pour tout le bassin ovine du sud-ouest de la France.

Figure 3 : répartition de la paratuberculose caprine en France



Concernant l'espèce caprine, les forts pourcentages de cheptels infectés mis en évidence en Bretagne et en Normandie illustrent très certainement une meilleure connaissance de la prévalence de cette maladie dans ces départements (plusieurs campagnes de dépistage généralisé ayant été mises en œuvre dans ces régions), plutôt qu'une sensibilité à la maladie plus élevée dans cette espèce (ce fait n'aurait pas été documenté dans la littérature).

La répartition des cas apparaît très différente de celle observée pour les ovins : à l'exception de l'extrême Nord, la maladie semble quasiment ubiquiste en France, avec un petit nombre de cas signalés dans la plupart des départements susceptibles de posséder cette information.

En Bretagne, en Normandie et en Corse, les pourcentages de cheptels infectés sont nettement plus élevés, allant jusqu'à 65 % en Corse.

Le croisement de cette carte avec celle des effectifs caprins (les principales régions de production caprine étant le Poitou-Charentes, la Vendée et le couloir Rhodanien), montre que la maladie est signalée dans tous les départements des principaux bassins de production.

Toutefois, pour ces deux espèces, les pourcentages de cheptels reconnus infectés par *Map* ne doivent en aucun cas être assimilés à la prévalence. Compte tenu des données très incomplètes (notamment en raison de l'absence de recensement systématique des cas), ils sont probablement en deça de la réalité et ce, , dans une assez forte proportion.

La paratuberculose est donc actuellement fortement sous-diagnostiquée chez les petits ruminants, et les chiffres actuellement disponibles ne reflètent au mieux que la « partie émergée de l'iceberg ».

I.1.2.2. Evolution dans le temps

Dans un élevage, la paratuberculose apparaît quelquefois après l'introduction d'un animal infecté. Cependant, du fait de la durée d'incubation de la maladie, qui est comprise entre quelques mois à plusieurs années le plus souvent, le lien entre l'arrivée de l'animal infecté dans le troupeau et l'apparition de la maladie est souvent difficile à établir.

A l'intérieur d'un cheptel, l'évolution est généralement lente. La maladie apparaissant d'abord sous forme sporadique avant de devenir très souvent enzootique.

Le taux d'infection dans un troupeau peut aller jusqu'à 70%, le nombre d'animaux en phase clinique de paratuberculose dépassant rarement 10% (entre 3 et 5 % par an en moyenne, voire un peu moins).

Il est estimé que 5 à 10 % des infectés latents développent une forme clinique sévère.

Au sein d'un cheptel atteint de paratuberculose, les animaux peuvent être répartis dans quatre catégories :

- **animaux sains, non infectés mais exposés**
- **animaux infectés non excréteurs (asymptomatiques)**
- **animaux infectés excréteurs (asymptomatiques), ces animaux ne pouvant être détectés que par des examens de laboratoire**
- **animaux malades, en phase clinique de paratuberculose**

I.1.2.2.1. Effet de la saison sur la maladie et son expression

Pour le dépistage de la paratuberculose, il est nécessaire de savoir si la réponse sérologique de l'animal est stable et identique au cours du temps ou s'il existe un effet saison, qui ne doit pas être confondu avec le stade physiologique de l'animal (dans le cadre de mises-bas groupées par exemple).

Aucun effet de la saison sur la proportion de bovins séropositifs pour *Map* (méthode ELISA) n'a été mis en évidence.

De même, aucun lien n'a été mis en évidence entre la température extérieure et le taux d'excrétion de *Map* dans les matières fécales (Strickland, S.J. *et al.* 2005).

I.2. Epidémiologie analytique

I.2.1. Sources de contamination et matières virulentes

I.2.1.1. Sources de contamination

Les sources de contamination de la paratuberculose sont majoritairement des sources animales, et principalement les animaux infectés et excréteurs ; les sources de matières virulentes sont ainsi représentées par :

- les animaux cliniquement malades
- les animaux infectés asymptomatiques qui peuvent être excréteurs de bacilles paratuberculeux. Cette excrétion peut débuter jusqu'à un à deux ans avant l'apparition des premiers symptômes).

Toutefois, nous verrons que l'environnement (et la faune sauvage comme décrit précédemment) peut dans certains cas jouer un rôle épidémiologique non négligeable, étant donné les capacités de résistance, et la persistance du bacille de la paratuberculose.

Comme nous l'avons mentionné auparavant, il existe une certaine spécificité d'espèce pour les souches de *Map*, en particulier pour les souches ovines. Cependant, les contaminations entre espèces ont été décrites à plusieurs reprises, et reproduites expérimentalement entre ruminants domestiques, que ce soit au pré ou à l'étable. Cette transmission ne s'accompagne pas forcément de manifestations cliniques mais peut jouer un rôle non négligeable sur le plan épidémiologique.

I.2.1.2. Matières virulentes

Les matières virulentes sont principalement constituées par les matières fécales, qui contiennent de 10^2 à 10^{10} UFC/g de fèces, selon le stade évolutif de la maladie chez les ruminants.

Le bacille a pu être également isolé dans le colostrum et dans le lait. Il faut souligner que le rôle épidémiologique des sécrétions mammaires est particulièrement important dans la mesure où elles sont distribuées de manière répétée aux jeunes animaux qui sont les plus réceptifs.

Différentes études ont mis en évidence (cf. infra) l'existence d'une excrétion du bacille paratuberculeux dans le sperme, même en l'absence d'excrétion fécale. Cependant la dose

infectieuse est probablement insuffisante pour infecter la femelle saillie ou inséminée par voie génitale.

Le transfert embryonnaire a également été évoqué parmi les facteurs de risque de transmission de la paratuberculose, nous en discuterons ultérieurement (paragraphe I.2.3.2.2.3.).

I.2.2. Facteurs de réceptivité de la paratuberculose des ruminants domestiques.

L'incidence de la forme clinique est maximale chez les jeunes adultes, après la première mise bas, voire la seconde (phénomène particulièrement observé dans les cheptels laitiers).

Les animaux s'infectent très majoritairement durant les premiers mois de vie ; néanmoins les signes cliniques ne sont habituellement observés qu'à l'âge adulte, à la suite d'une longue période d'incubation de la maladie.

En effet, les animaux sont plus réceptifs entre l'âge de zéro à six mois, en raison de la structure morphologique du système immunitaire digestif, de la moindre réponse cellulaire du jeune et des conditions physico-chimiques favorables au sein du tube digestif.

La contamination d'un animal adulte est possible si la pression d'infection est particulièrement forte; mais en raison de la durée d'incubation et d'une réceptivité plus faible, ces animaux ne développent que rarement la forme clinique. Ils peuvent cependant excréter le bacille à un niveau détectable, par coproculture par exemple.

I.2.2.1. Implication du système immunitaire

Chez le jeune, la plus grande réceptivité à l'infection est notamment due à deux paramètres :

- l'immaturation du système immunitaire, ayant pour conséquence des capacités de défense inférieures à celles de l'adulte
- le nombre de plaques de Peyer plus élevé qu'à l'âge adulte
- de plus, la présence d'anticorps maternels (principalement dans le colostrum, mais aussi le lait) pourrait favoriser la capture des mycobactéries par les cellules M des plaques de Peyer dans l'intestin. Nous verrons ultérieurement que le passage de Map dans le lait ou colostrum tend de plus à augmenter l'infectiosité du bacille (paragraphe I.2.3.4.5.).

-
Chez l'adulte, l'apparition des signes cliniques en péri-partum immédiat chez un animal préalablement asymptomatique (voire ayant montré une diminution des signes cliniques au cours de la lactation précédente), s'explique en partie par la dépression immunitaire observée à cette période (plus marquée pour l'immunité à médiation cellulaire).

I.2.2.2. Conditions physico-chimiques au sein du tube digestif

Comme nous le verrons par la suite, la principale voie de contamination chez le jeune pré-ruminant est la voie orale.

Les germes arrivent directement dans la caillette chez le jeune (grâce au mécanisme de fermeture de la gouttière oesophagienne), alors qu'ils séjournent dans le rumen chez l'adulte.

Or, dans le rumen, les conditions sont peu favorables à la survie et à la multiplication de *Map* : pH de 6 à 8, conditions anaérobies, dilution dans le flux ruminal, présence d'une faune et d'une flore de compétition.

Ceci explique en partie la moindre sensibilité des adultes. En effet, le pH plus élevé et l'absence de protéine transporteuse de fer, nécessaire au métabolisme de *Map* pour assurer sa survie, diminue les capacités à infecter l'animal.

Au contraire chez le jeune pré-ruminant, le pH est compris entre 2 et 4, et la flore bactérienne n'est pas encore établie ; la réaction inflammatoire ainsi provoquée recrute des macrophages qui peuvent céder aisément de la lactoferrine – molécule chélatrice de fer – qui est présente dans le lait, permettant ainsi le métabolisme des mycobactéries.

I.2.2.3. Prédisposition génétique

Toutes les espèces et races de ruminants sont réputées sensibles. Toutefois la possibilité d'une prédisposition génétique a souvent été évoquée, que ce soit dans les espèces bovines ou ovines. Elle pourrait ainsi permettre d'expliquer une partie de la différence d'incidence en fonction des régions d'élevage

Cependant d'autres facteurs peuvent intervenir. Un niveau de performance élevé (races laitières par exemple) peut se traduire par une moindre résistance de l'animal tant au moment de l'infection qu'au moment de l'expression clinique de la paratuberculose.

L'influence et/ou la prédisposition génétique ont été étudiées par différents auteurs, que ce soit chez des bovins ou des ovins.

Ce phénomène, si il se confirmait, serait d'autant plus important à exploiter dans le cadre de la paratuberculose, que la maladie est incurable, et qu'il n'existe aucun vaccin complètement efficace à ce jour.

Concernant les bovins, trois études portent notamment sur l'héritabilité de la sensibilité à l'infection par *Map*.

Dans une première étude, basée sur une estimation post-mortem des carcasses, l'héritabilité fut estimée entre $<0,01$ et $0,09$ à l'aide de 3020 bovins laitiers allemands. Le modèle mathématique utilisé étant un modèle à seuil (Koets *et al.* 2000).

Cette héritabilité fut également explorée à l'aide de sérologies ELISA sur lait (Mortensen *et al.* 2004). L'héritabilité estimée a été de $0,102$, à l'aide de 11535 vaches Holstein d'origine danoise. Le modèle mathématique utilisé était un modèle linéaire bivarié (l'autre variable étant la production laitière journalière).

Une troisième étude a estimé l'héritabilité de cette sensibilité à l'aide de deux méthodes de laboratoire : la culture fécale radiométrique et la sérologie ELISA (trousse Idexx), en prenant une valeur *S/P* de $0,25$ (Gonda, M.G. *et al.* 2006). Divers modèles mathématiques ont été utilisés.

Cette étude comporte 4603 vaches, issues de 238 cheptels, et filles de 46 taureaux différents.

Les héritabilités estimées à partir des 2 tests utilisés de façon isolée sont identiques.

L'héritabilité obtenue par la méthode de culture est de 0,153 (modèle mathématique à seuil, Posterior Standard Deviation ou PSD : 0,115).

L'héritabilité obtenue par la méthode ELISA varie de 0,159 (modèle linéaire, PSD : 0,090) à 0,091 (modèle ordonné à seuil, PSD : 0,053).

L'héritabilité obtenue par combinaison des 2 méthodes d'analyse est de **0,102** (modèle à seuil, **PSD : 0,066**).

Les auteurs estiment que cette donnée semble être la plus cohérente avec l'héritabilité réelle.

Bien que l'héritabilité estimée de la paratuberculose est faible (0,102 ; les bovins les plus sensibles ont un risque 1,16 fois plus élevé d'être atteint de paratuberculose que les moins sensibles), les auteurs des différentes études s'accordent sur le fait que la sensibilité à l'infection par *Map* est héritable. Et ainsi qu'une sélection génétique pour augmenter la résistance des bovins à *Map* devrait être réalisable.

La prédisposition génétique aux infections par *Map* a également été étudiée chez des ovins de race Merinos, au sein de troupeaux où la prévalence de paratuberculose clinique était forte (classification en fonction du phénotype, de la sévérité des lésions, de l'histopathologie, du résultat des cultures fécales, de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ou humorale).

Les corrélations avec le phénotype ont été recherchées en fonction du polymorphisme au locus de gènes intervenant dans l'orientation de la réponse immunitaire (NRAMP, CMH, leukaemia inhibiting factor...).

De possibles associations entre des allèles particuliers des gènes NRAMP, CMH et la sensibilité / résistance à la paratuberculose ont été détectées. (Reddacliff, L.A. *et al.* 2005).

Chez les bovins, Gonda *et al.*, notamment suite à leur étude démontrant l'existence d'une héritabilité de la sensibilité à la paratuberculose (Gonda, M.G. *et al.* 2006), ont cherché à identifier des QTL (locus à effets quantitatifs) jouant un rôle dans cette héritabilité (Gonda, M.G. *et al.* 2007).

Les méthodes analytiques (culture et sérologie) pour dépister les infectés furent utilisées de façon identique à la première expérience (cf. ci-dessus).

L'étude a cette fois porté sur 4350 vaches, issues de 12 taureaux différents. Parmi cette population, 3 familles ont été sélectionnées sur la base d'une forte prévalence apparente de la paratuberculose (6,8 à 10,4% des vaches infectées), une fréquence élevée de culture fécale positive (46,2 à 52,9% de cultures fécales positives) et un grand nombre de filles testés pour la paratuberculose (264 à 585 filles pour chaque taureau).

En moyenne 159 microsatellites ont été testés dans chaque famille. Suite à une étude préliminaire, huit régions chromosomiques ont été identifiées comme possiblement liées à la susceptibilité aux infections à *Map* ($P < 0,01$).

Après génotypage plus précis (de 3 à 5 microsatellites) des résultats significatifs (8 régions chromosomiques suspectées, familles sélectionnées), la présence d'un QTL associé à une variation de sensibilité à l'infection fut mis en évidence sur le chromosome bovin 20.

En effet, sur le chromosome 20, 2 microsatellites séparés de 20 cM sont liés à une forte sensibilité à l'infection. La substitution de l'allèle « sensible » par l'allèle « résistant » engendre une baisse de 21% de la probabilité d'infection par *Map*.

Cette étude est la première à avoir identifié un QTL affectant potentiellement la sensibilité à l'infection par *Map* chez les bovins.

Toutefois, cette étude n'a pas permis d'identifier un marqueur génétique fortement lié au QTL incriminé, et qui justifierait son utilisation dans le cadre d'une sélection s'appuyant sur des marqueurs génétiques. Des études ultérieures sont donc nécessaires et attendues.

I.2.3. Voies de contamination

Le mode de transmission de la paratuberculose est essentiellement indirect, par l'intermédiaire de l'alimentation, de l'abreuvement, ou de l'environnement souillés par des matières fécales contaminées.

La transmission directe de la mère au jeune (considérée comme pseudo-verticale) est documentée à la fois via le colostrum et le lait, le colostrum semblant plus fréquemment et plus fortement contaminé que le lait.

La transmission directe verticale est possible et documentée *in utero* ; cela représente une différence importante avec l'agent de la tuberculose qui ne peut pas être transmis par cette voie.

I.2.3.1. Voies de contamination indirecte

I.2.3.1.1. Contamination oro-fécale par le biais de l'environnement, de l'eau ou des aliments

La contamination indirecte du jeune (considérée comme horizontale), peut s'effectuer de différentes manières :

- dans le box de mise-bas, que ce soit par les matières fécales de la mère ou d'une parturiente précédente.
- au moment de la têtée si les trayons sont souillés.
- par l'utilisation de matériel de distribution des aliments (ou de l'eau de boisson selon l'âge) contaminé par des fèces
- par les vêtements ou les bottes du personnel.

Il apparaît que le risque de contamination d'origine fécale est étroitement lié au niveau d'excrétion fécale ; la dose orale permettant l'installation de l'infection chez les ruminants domestiques est estimée à 10^{4-7} CFU/animal ; cette dose infectante varie en fonction de l'âge de l'animal et de son statut immunitaire.

I.2.3.1.2. Contamination par les voies respiratoires

L'aérosolisation de mycobactéries à partir de la surface de l'eau (et à partir de microbulles d'air présentes dans l'eau) est parfaitement décrit (Falkinham, J.O., III, 2003).

En effet, à cause de la forte teneur lipidique (60%) de la membrane cellulaire constituée d'une double couche, *Map* possède des propriétés hydrophobes ; de ce fait, les

bacilles se trouveraient concentrés au sein des bulles d'air présentes dans les colonnes d'eau, mais également au sein des aérosols qui se forment à l'interface air/eau.

Les germes présents dans les aérosols contaminés (et vraisemblablement contaminants) pourraient ainsi couvrir de grandes distances grâce au vent : ils permettraient ainsi une contamination soit par voie respiratoire, soit par voie digestive une fois déposés sur les pâtures, puis après ingestion par les espèces sensibles. (Whittington *et al.* 2005).

De plus, bien que cela soit sujet à controverses, l'inhalation de ces aérosols a été suggérée comme une possible voie de contamination par *Map* tant pour les animaux que pour les humains (Pickup, R.W, *et al.* 2005 ; Corner L.A. *et al.* 2004), notamment par analogie avec *Mycobacterium bovis* chez les bovins.

Cette hypothèse n'a toutefois pas été testée dans les conditions expérimentales.

I.2.3.2. Voies de contamination directe

I.2.3.2.1. Contamination par voie sexuelle

Map a déjà été détecté dans le sperme d'un taureau (Ayele, W.Y. *et al.* 2004), en l'absence d'excrétion fécale ; la paratuberculose peut donc potentiellement être transmise par voie sexuelle.

Map a également pu être isolé à partir des testicules d'un taureau de 6 ans qui était en phase clinique avancée (Glawischnig, W. *et al.* 2004). Alors que l'isolement de *Map* a été possible à partir du tissu testiculaire après 8 semaines de culture, aucune lésion macroscopique n'a été observée (toutefois, ce résultat positif pourrait possiblement être du à une phase de bactériémie au moment de l'abattage).

La question d'un risque de transmission par voie sexuelle reste donc posée, de même que la gestion de cette possibilité dans le cadre de l'insémination artificielle.

Néanmoins, la majorité des auteurs s'accordent à penser que non seulement la dose infectieuse est probablement insuffisante pour infecter la femelle saillie ou inséminée, mais en plus que la voie de contamination est inadéquate pour permettre l'infection.

I.2.3.2.2. Contamination directe verticale (*in utero*)

L'infection du fœtus *in utero*, à travers la barrière placentaire, a fait l'objet de nombreuses études (Seitz, S.E. *et al.* 1989 ; Sweeney, R.W. *et al.* 1992).

I.2.3.2.2.1. Dans l'espèce bovine

Dans l'espèce bovine, la transmission transplacentaire surviendrait chez 40% à 50% des femelles au cours de la paratuberculose clinique, et chez 8-10% des femelles au stade sub-clinique de la maladie.

Etant donné que la placentation chez les bovins est syndesmochoriale, la muqueuse utérine est le seul tissu maternel à être érodé au moment de la nidation, et il n'existe donc qu'un faible contact entre le sang maternel et le sang fœtal.

Il est estimé qu'une transmission transplacentaire pourrait se produire chez les vaches dont le niveau d'excrétion est au minimum de 3000 germes /g. Cependant en pratique, en raison des variations de l'excrétion, cette relation est difficile à établir.

I.2.3.2.2.2. Chez les petits ruminants

D'après une étude effectuée chez des moutons appartenant à des troupeaux où la pression d'infection est forte, les résultats semblent converger entre les deux espèces (Lambeth, C. *et al.* 2004).

Lors de cette étude, parmi cinq brebis en phase clinique de paratuberculose, toutes portaient des fœtus infectés (100%).

La descendance d'une seule brebis, parmi les 54 qui étaient au stade sub-clinique, était affectée (1,8%), alors qu'elle ne l'était pas pour les 47 non-infectées.

Ainsi selon l'auteur, la contamination par cette voie étant très peu fréquente sauf chez les animaux qui ont déclaré la maladie, ces voies de transmission ne sont pas susceptibles de compromettre les plans de contrôle pour la maîtrise de la paratuberculose ovine dans la plupart des cas, et plus particulièrement dans les élevages qui réforment rapidement tout animal qui déclare la maladie.

I.2.3.2.2.3. Risque inhérent à la transplantation embryonnaire

La méthode de transplantation embryonnaire amène elle aussi des interrogations, en terme de risque d'infection, particulièrement pour des vaches prélevées au stade sub-clinique de la maladie.

Plusieurs études ont analysé ce risque.

- Lors d'une étude réalisée sur des embryons cryopréservés, produits *in vitro* à partir de vaches en phase sub-clinique de paratuberculose, aucune preuve de la présence de *Map* ne fut apportée (Perry, G.H. *et al.* 2006).

L'étude portait sur 109 embryons obtenus à partir de 267 complexes cumulo-ovocytaires collectés à partir de 12 vaches en bon état général mais positives en sérologie ELISA. Les embryons ont été préparés, lavés selon les protocoles standards décrits par la Société Internationale de Transfert d'Embryons.

Le risque est donc apparu très faible, voire nul, d'infecter des animaux sensibles à partir d'embryons prélevés sur des vaches en phase sub-clinique de paratuberculose lors de cette étude.

- Des résultats identiques furent obtenus par une autre étude (Bielanski, A. *et al.* 2006), s'intéressant aux risques liés au transfert d'embryons, que les ovocytes aient été fertilisés *in vivo* ou *in vitro*.

Lors de cette deuxième étude, plusieurs cas de figure furent explorés : collecte d'embryons réalisée chez cinq donneuses asymptomatiques (naturellement infectées) ; collecte d'ovocytes à partir de deux donneuses naturellement infectées, et présentant des signes cliniques de paratuberculose ; exposition d'embryons fertilisés *in vivo* ou *in vitro*, puis transférés chez des receveuses saines ; et enfin transfert d'embryons sains chez des receveuses naturellement infectées mais asymptomatiques.

Aucun des embryons prélevés, ni aucun des ovocytes ne furent testés positifs pour *Map*, que ce soit après culture (n=19) ou par PCR (n=13).

Néanmoins, tous les embryons fécondés *in vivo* et exposés à *Map in vitro* furent testés positifs pour *Map*, que ce soit par culture (n=12) ou par PCR (n=15), de même pour les embryons fertilisés *in vitro*.

De plus, pour accroître les chances de mettre en évidence la mise en place d'une infection, deux paramètres furent optimisés :

- deux embryons étaient transférés chez la même donneuse,
- des embryons produits *in vitro* ont été utilisés (il a été démontré que de nombreuses bactéries et agents pathogènes adhèrent plus facilement à la surface de la zone pellucide chez les embryons produits *in vitro*, en comparaison avec les embryons produits *in vivo*).

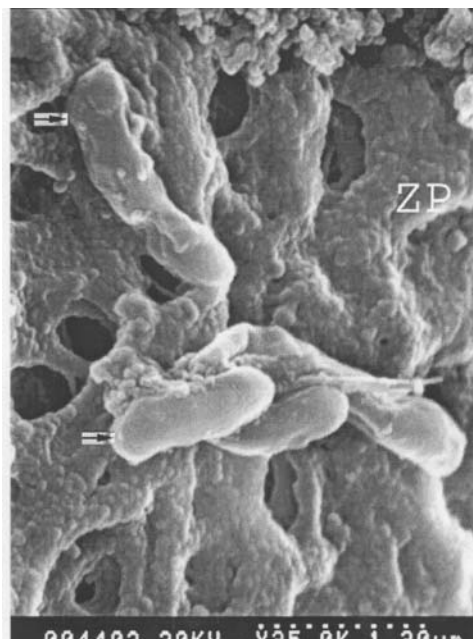
Le transfert des embryons, qu'ils soient fertilisés *in vivo* ou *in vitro* (et potentiellement contaminés), chez 28 receveuses permis 13 gestations et l'obtention de 8 veaux nés.

Aucune transmission de la maladie ne fut faite tant chez les veaux que chez les receveuses après une durée de suivi de cinq ans.

Chez les deux donneuses montrant des signes cliniques de la maladie, les fluides folliculaires et les complexes cumulo-ovocytaires furent testés positifs pour *Map*.

En outre, cette expérience démontra également que la zone pellucide est une barrière efficace de protection pour les cellules embryonnaires vis-à-vis de *Map* (Figure 4).

Figure 4 : agrandissement au microscope électronique montrant un blastocyste bovin avec des germes de *Map* (flèche) adhérant à la zone pellucide (ZP)



En conclusion, il est donc très peu probable que *Map* soit transmis par le biais d'une transplantation embryonnaire, à condition que les embryons soient lavés selon les recommandations de la Société Internationale du Transfert d'Embryon.

A ce jour, dans la littérature disponible, aucun cas de transmission de la paratuberculose par transplantation embryonnaire n'a été décrit, que ce soit chez les vaches receveuses ou les bovins nés de ces transferts.

I.2.3.2.3. Contamination par le colostrum ou le lait (contamination pseudo-verticale)

La transmission pseudo-verticale intervient lors de la tétée du jeune.

En effet, *Map* peut être présent tant dans les sécrétions lactées que colostrales (Streeter, R.N. *et al.* 1995 ; Taylor, T.K., Wilks, C.R. *et al.* 1981), chez des ruminants en paratuberculose clinique ou sub-clinique.

Selon les estimations, 35% des bovins atteints de paratuberculose clinique, et 3 à 10% des animaux infectés asymptomatiques excrètent des bacilles de *Map* dans les sécrétions mammaires.

Dans des échantillons de lait obtenus de façon stérile chez 9 vaches en phase sub-clinique de paratuberculose (Sweeney, R.W. *et al.* 1992), les concentrations de *Map* observées furent de 2 à 8 UFC/ml (soit de 0,3 à 0,9 log UFC/ml).

Dans une étude (Lambeth, C. *et al.* 2004) effectuée chez des brebis au stade clinique et sub-clinique, appartenant à des troupeaux fortement infectés, *Map* ne fut isolé par culture de tissu mammaire et des sécrétions lactées que chez 2 brebis sur les 76 examinées (2,6%), toutes deux étaient en phase clinique de paratuberculose.

Lors d'une autre étude menée sur une période de 6 mois (Nebbia, P. 2006), des échantillons de lait furent prélevés régulièrement chez 20 brebis et 9 chèvres issues de cheptels infectés, et testés par PCR nichée (ciblant la séquence d'insertion *IS900*). L'ADN de *Map* fut détecté de manière intermittente sur 13 animaux parmi les 29 testés ; cela correspondant à 9 des 15 animaux séropositifs, et de 4 des 14 animaux séronégatifs.

Bien que l'excrétion dans le lait semble inférieure à celle observée chez les bovins, elle existe également chez les petits ruminants, aussi bien durant la phase clinique que la phase asymptomatique de la paratuberculose.

Le lait cru des petits ruminants représenterait donc une source réaliste de matière virulente pour les jeunes, et ainsi une source de contamination.

La possibilité de traitements permettant d'assurer la décontamination du lait et du colostrum sera évoquée ultérieurement.

I.2.3.3. Principaux facteurs de risque de la paratuberculose en élevage

La transmission de l'infection par ces différents mécanismes est étroitement dépendante des facteurs de risque. Les plus importants concernent les modalités d'élevage des veaux, de la naissance jusqu'au sevrage (Tableau 2 ; Vialard, J. 2002)

Tableau 2: principaux facteurs de risque (majeurs et mineurs) de la paratuberculose en élevage

RISQUES MAJEURS	
Parturition et période néonatale	Période d'élevage des veaux
<ul style="list-style-type: none"> ● Absence de nurserie ● Litière accumulée, nettoyage et désinfection peu fréquents ● Absence de séparation pour le vêlage des vaches atteintes ● Proximité d'animaux cliniquement atteints ou suspects ● Absence de séparation des nouveau-nés de la mère ● Elevage de type allaitant ● Consommation du colostrum de la mère éventuellement infectée ● Mère cliniquement atteinte ou positive à un test 	<ul style="list-style-type: none"> ● Veaux alimentés avec du colostrum potentiellement contaminé ● Veaux alimentés avec du lait potentiellement contaminé ● Veaux vivants dans les mêmes locaux que les mères ● Alimentation du veau pouvant être contaminés par des fèces

RISQUES MINEURS	
Du sevrage à l'âge adulte	A l'âge adulte
<ul style="list-style-type: none"> ● Contact avec des vaches adultes ou avec du fumier ● Contamination possible de l'alimentation ● Contamination possible de l'abreuvement ● Pâturage commun avec des adultes ● Contamination des prés par le fumier 	<ul style="list-style-type: none"> ● Mélange avec des bovins d'origine non contrôlée ● Fréquence élevée des introductions depuis des cheptels non contrôlés (achat)

I.2.3.4. Modèle infectieux expérimental

I.2.3.4.1. Difficultés rencontrées à l'établissement du modèle infectieux

Afin de mieux préciser un plan de lutte contre la paratuberculose des ruminants domestiques, il est nécessaire de connaître les interactions existantes entre le pathogène et son hôte, et les modalités d'infection.

De même, pour étudier les effets précoces des interventions préventives et thérapeutiques envers la paratuberculose chez les ruminants, l'obtention d'un modèle expérimental fiable est indispensable; puisque le principal inconvénient du modèle « naturel » est un temps d'incubation très long.

En effet, même si les informations les plus intéressantes sur cette interaction seraient obtenues en utilisant l'hôte naturel dans les études d'infection, les ruminants, hôtes naturels de *Map*, doivent héberger la mycobactérie pendant 2 à 3 ans avant d'exprimer la paratuberculose clinique.

L'utilisation des ruminants est donc limitée, et de nombreux autres modèles animaux ont été utilisés, incluant le poulet, le cochon d'Inde, le hamster, la souris ou bien encore le lapin...qui n'expriment pas aussi pleinement l'infection.

Par exemple, l'inoculation orale à des lagomorphes de 10^8 UFC de *Map* environ ne provoque des signes cliniques et/ou histologiques que chez 62 à 75% des animaux.

A contrario, 100% des veaux inoculés avec une dose orale de 10^6 CFU de *Map* déclarent une paratuberculose clinique (Harris, N.B. *et al.* 2001).

Concernant le développement de modèles expérimentaux, on peut considérer que chaque équipe a développé un modèle indépendamment des autres... En conséquence, il existe une forte variabilité des résultats expérimentaux au sein d'une espèce animale, mais aussi entre les différentes espèces.

Cette variabilité est également liée à la souche de *Map* et à son mode de préparation, à la dose et au mode d'administration de l'inoculum.

Toutefois, une initiative récente vers une meilleure homogénéité des protocoles a été prise, afin de permettre une avancée plus harmonieuse des recherches menées par les différentes équipes.

En ce sens, un groupe de travail a été constitué (Hines II, M.E. *et al.* 2007), et qui a répertorié et analysé les différents protocoles qui ont été utilisés pour reproduire la paratuberculose chez les ruminants.

Les différents modèles infectieux bovin, ovin et caprin, ou chez des ruminants sauvages utilisés dans la littérature, et analysés dans l'étude citée ci-dessus, sont ainsi respectivement présentés en annexe 2, 3, 4 et 5.

I.2.3.4.2. Mécanismes généraux

D'après le schéma général qui est aujourd'hui admis par l'immense majorité des équipes du domaine, les bacilles, lors de la contamination qui est la plus fréquente, pénètrent dans la muqueuse intestinale en regard des formations lymphoïdes associées à l'intestin

(principalement les plaques de Peyer de l'iléon), sont phagocytés par les macrophages résidents et s'y multiplient.

Une lésion granulomateuse primitive se développe alors dans l'intestin grêle, et plus tard dans le côlon.

Les macrophages infectés gagnent alors les nœuds lymphatiques régionaux (et donc principalement le nœud lymphatique iléo-caecal), puis se redistribuent vers différents organes.

Il est admis que la persistance de *Map* dans les macrophages de l'hôte est cruciale pour l'établissement et la progression de la maladie.

La diffusion des bacilles paratuberculeux dans l'organisme se fait : soit par l'intermédiaire des macrophages infectés circulants, soit par voie lymphatique avec passage dans le sang via le canal thoracique, soit par la circulation veineuse porte (on observe alors une bactériémie, puis une septicémie, et ainsi la transmission *in utero* est possible).

La pathogénie de la paratuberculose serait principalement liée à une réponse inflammatoire granulomateuse dans la muqueuse et la sous-muqueuse intestinales, ainsi qu'à l'atrophie villositaire qui en découle.

La diarrhée chronique, principal symptôme de la maladie, est à la fois due à des phénomènes de malabsorption de l'iléon, à des sécrétions accrues, mais aussi à la perte de la capacité du côlon à réabsorber l'eau et les électrolytes. Les pertes protéiques engendrées, augmentées par la lymphangiectasie souvent associée, sont intenses et expliquent les pertes de poids très marquées.

La virulence de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* semble relativement faible, comme tendent à le prouver la longue incubation et l'évolution sur le mode chronique de la maladie. Il est toutefois à souligner que malgré l'importance de la paratuberculose, les mécanismes moléculaires impliqués dans la pénétration et la survie de *Map* chez l'hôte ne sont pas encore bien établis à ce jour.

La paratuberculose fait ainsi partie des maladies où plus que le pouvoir pathogène propre de l'agent infectieux, c'est surtout la réponse immunitaire de l'hôte qui détermine l'évolution clinique.

I.2.3.4.3. Etude du modèle infectieux expérimental chez les petits ruminants domestiques

Le modèle infectieux a été étudié chez les petits ruminants domestiques à l'aide d'une souche ovine de *Map* (Begg, D.J. *et al.* 2005b), l'inoculation consistant en l'administration par voie orale de 4 doses de 1×10^9 UFC de *Map* réparties sur une période de deux semaines.

Après six mois, sur 10 ovins autopsiés, aucun n'était porteur de lésion intestinale typique à l'analyse histopathologique, bien que 2 furent positifs en culture fécale.

Après neuf mois, 10 animaux ont été positifs en culture fécale, 9 (90%) présentant des lésions histopathologiques, 2 (20%) ayant également des lésions macroscopiques.

Sur les 10 animaux autopsiés à dix mois, 6 montrèrent des lésions macroscopiques s'accompagnant de lésions histopathologiques plus sévères qu'à 9 mois.

Une perte de poids avec conservation de l'appétit ne fut mise en évidence chez un ovin 11 mois après l'inoculation.

I.2.3.4.3.1. Les tonsilles pharyngiennes comme porte d'entrée ?

Lors de l'étude précédente chez des ovins, l'inoculation par voie orale fut comparée à une inoculation intra-tonsillaire ; après injection dans les tonsilles pharyngiennes, les lésions histologiques et macroscopiques typiques de la paratuberculose furent obtenues, que ce soient dans les nœuds lymphatiques intestinaux ou les tissus intestinaux eux-mêmes.

Bien que dans ce deuxième mode d'épreuve, la contamination se fasse par voie lymphoïde, *Map* montra un tropisme positif vers les tissus intestinaux ; il fut de plus établi, chez des ovins naturellement infectés par *Map*, que les nœuds lymphatiques rétropharyngiens pouvaient être infectés (De Lisle, G.W. *et al.* 2003).

Des expériences menées par Payne et Rankin, utilisant une dose orale élevée et unique au moment de l'inoculation, suggèrent là-aussi que les tonsilles pharyngiennes sont une porte d'entrée primaire consécutive à l'inoculation par voie orale, et que les lésions intestinales ne se développent que plus tard.

Bien que des avis divergeant existent quant à la porte d'entrée initiale pour *Map* (les tonsilles pharyngiennes ou les cellules M des plaques de Peyer selon les études). la majorité des auteurs s'accordent toutefois sur une entrée primitive via les cellules M des plaques de Peyer.

I.2.3.4.4. Etude du modèle infectieux expérimental chez les grands ruminants domestiques

Un modèle expérimental fut proposé chez les bovins par Sweeney *et al.* (Sweeney, R.W. *et al.* 2006).

Des doses orales supérieures ou égales à $1,5 \times 10^6$ UFC de *Map* provoquent une infection qui peut être détectée 3 semaines après inoculation ; la détection de cette infection nécessitant alors la mise en culture de nombreux prélèvements intestinaux (l'examen histologique ne permet pas à ce stade précoce de détecter l'infection).

Les résultats obtenus lors de cette étude suggèrent que la muqueuse intestinale, plutôt que les tonsilles pharyngiennes, est la première porte d'entrée pour *Map*.

Dans cette étude, *Map* a pu être isolé de l'intestin et les nœuds lymphatiques mésentériques chez tous les animaux.; en outre, un isolement positif a été possible à partir d'un organe extra-digestif (respectivement la rate et les tonsilles pharyngiennes) chez seulement un veau à chaque fois parmi les 26 infectés. Le nœud lymphatique iléo-caecal est donc un relèvement adapté pour la recherche de *Map*.

Les veaux ayant reçu les doses d'inoculation les plus fortes ($2,5 \times 10^{10}$), ont en moyenne un plus grand nombre d'échantillons tissulaires positifs en culture (c'est notamment le cas pour les deux veaux présentant chacun un organe extra-digestif positif en culture), ainsi qu'un nombre total de colonies plus élevé.

I.2.3.4.5. La glande mammaire, réservoir et voie de contamination potentiels

La contamination par voie gastro-intestinale résulte, le plus probablement de l'infection des cellules M des plaques de Peyer.

Or, l'invasion de la muqueuse intestinale dépend de facteurs, qui sont aussi nombreux que complexes (Patel, D. *et al.* 2006) : c'est notamment l'exemple de la connexion de *Map* à la fibronectine, ou le rôle d'une protéine mycobactérienne de 35 kDa, qui n'est exprimée que dans des conditions hyperosmolaires et anaérobies.

Le rôle potentiel de cette protéine mycobactérienne est à rapprocher du fait que de nombreuses études ont noté la présence de *Map* dans les glandes mammaires, ainsi que dans le lait et le colostrum des bovins, tant en phase clinique que pendant la phase asymptomatique (notamment Streeter, R.N. *et al.* 1995). Cette observation soulève donc la possibilité que la glande mammaire puisse être un réservoir de bacilles, et que les cellules épithéliales mammaires (au même titre que les macrophages, principaux représentants des cellules de l'immunité mammaire) puissent représenter un site d'infection pour le pathogène.

Or le milieu interne de la glande mammaire est un milieu hyperosmolaire (lait) et hypoxique. On peut donc penser que le passage de *Map* dans ce milieu va modifier ses capacités infectieuses ; en fait, *Map* possède la capacité de rester au contact (soit du milieu intracellulaire au sein des cellules épithéliales ou macrophages, soit du lait) pendant plus de 24 heures avant d'être excrété.

En outre, des études antérieures ont démontré que l'environnement auquel une bactérie est exposée chez l'hôte peut influencer l'expression de gènes associés à la capacité de pénétration dans les cellules épithéliales.

L'incubation de *Map* dans des conditions de basse pression en oxygène ou dans des milieux hyperosmolaires augmente sa capacité à pénétrer dans les cellules épithéliales de l'intestin (Bermudez, L.E. *et al.* 1997), notamment par la présence de la protéine de 35 kDa précédemment citée.

L'efficacité de l'invasion est significativement augmentée lorsque *Map* est pré-incubé pendant 24 heures dans le lait, par comparaison avec d'autres milieux tels que l'eau ou un autre milieu iso-osmolaire. De plus, la différence n'est pas liée à un des composants du lait, mais bien à son osmolarité.

Pour les mêmes raisons, l'efficacité d'invasion est significativement supérieure (environ 10 fois) pour des cellules de *Map* collectées à partir de cellules épithéliales infectées et maintenues pendant 1 à 4 jours, en comparaison avec des cellules incubées dans un milieu de culture usuel.

Il faut également noter que l'invasion de la glande mammaire, de manière expérimentale, est possible tant par la surfaces apicale que baso-latérale des cellules.

Ainsi, l'infection de la glande mammaire pourrait théoriquement s'établir autant par voie systémique que par voie ascendante (donc par contamination extérieure).

Les cellules épithéliales de la glande mammaire serviraient potentiellement de réservoir pour *Map*, et de source de contamination pour les jeunes veaux.

Cette idée est également confortée par l'observation de vacuoles cytoplasmiques de *Map* dans les cellules épithéliales mammaires (comme c'est le cas dans les macrophages), ainsi que la survie de *Map* au sein de ces cellules pendant plusieurs jours *in vitro*.

I.2.4. Persistence

Map est actuellement considéré comme un agent pathogène parasite obligatoire des animaux ; en effet il ne peut se multiplier que chez un hôte sensible, au sein des macrophages (Collins, M.T. 2003). Néanmoins, comme nous allons le voir, il possède la capacité à survivre très longtemps, dans des conditions extrêmes.

I.2.4.1. Persistence dans le sol

Connaître la persistance de *Map* dans les différents types de sol est une donnée épidémiologique d'intérêt majeur dans les plans de lutte contre la paratuberculose des ruminants.

Par exemple en Australie, où les productions animales représentent 13 milliards de dollars dans la balance commerciale chaque année (données 2003), des recherches furent menées sur la faisabilité d'éradiquer la paratuberculose ovine par la destruction des troupeaux contaminés, qui pâturent la quasi-totalité de l'année, et de repeupler avec des troupeaux sains. Néanmoins, pour la réussite de plans d'éradication tels que ceux-là, le temps requis pour l'élimination du pathogène à la surface des pâtures, afin d'éviter la contamination des animaux nouvellement introduits, doit être parfaitement connu.

Pour cela, de nombreuses études ont été réalisées sur la survie de *Map* dans l'environnement, avec généralement une viabilité de longue durée (sauf dans quelques situations tels que dans les abattoirs, où de l'urine est également présente, les silos avec de faibles pH ou des teneurs en ammoniac élevées (Katayama, N. *et al.* 2000 et 2001).

- En 2003, une recherche de *Map* fut effectuée sur des sols, eaux et sédiments dans des zones fréquentés par des troupeaux (ovins et caprins) atteints de paratuberculose clinique. L'intérêt de cette étude provient principalement du fait qu'il s'agit d'une contamination naturelle des échantillons.

Les échantillons ont été prélevés dans 6 fermes distinctes, et la présence de *Map* a été détectée dans le sol d'une seule ferme, 5 mois après le retrait des animaux infectés, et aucune au bout de 12 mois après le déstockage.

Sur 17 échantillons d'eau et 17 échantillons de sédiments issus des 6 fermes infectées, un seul échantillon d'eau et un échantillon de sédiments furent positifs en culture.

Un échantillon sédimentaire a été positif 12 mois après le déstockage (sur 96 prélèvements d'eau, 90 sédimentaires et 93 à partir du sol)(Whittington, R.J. *et al.* 2003).

- Une autre étude à l'aide d'une souche ovine fut menée dans des conditions de terrain. Les mesures furent réalisées sur des pâtures naturelles, et sur des lots de terre expérimentaux ensemencés en herbe. Les deux supports ont été contaminés avec des fèces de moutons infectés, les prélèvements étant réguliers pendant 117 semaines.

Les résultats indiquent une persistance extrême dans l'environnement, avec une survie supérieure à 1 an en milieu naturel.

Map survit pendant plus de 55 semaines dans les matières fécales laissées sur le sol, à l'obscurité, mais pendant des durées plus courtes dans des lieux ensoleillés.

De même, *Map* fut isolé pendant plus de 24 semaines sur les parties aériennes des plantes (suite à la germination, les pousses transpercent la surface du sol et les fèces, se contaminant très certainement durant cette phase) (Whittington, R.J. *et al.* 2004).

Pour souligner encore ces très longues durées de survie, il ne faut pas omettre que celles-ci, de même que les décomptes d'organismes viables, sont sous-estimés par la faible sensibilité des méthodes de culture utilisées, de même que par l'attachement des mycobactéries aux particules du sol (et qui sont donc éliminées lors de l'étape de sédimentation). Il est estimé que cette réduction peut atteindre 90 à 99% lors du comptage d'organismes viables.

En supposant une décontamination de type log-linéaire, la durée de survie mesurée de *Map* dépend également du degré de contamination initial.

Il sera ainsi important de mesurer les niveaux de baisse, car cela permettrait l'extrapolation à des situations où les niveaux de contamination initiaux seraient différents. Les échelles de décontamination estimées fluctuent entre 2,2 et 0,4 log par mois ; les niveaux de décontamination étant plus importants dans les zones exposées aux UV par rapport aux zones ombragées.

1.2.4.1.1. Facteurs influençant la persistance de *Map* dans le sol.

Lors de l'étude de Whittington *et al.* (Whittington, R.J. *et al.* 2004), des facteurs tels que l'humidité ou le pH du sol, la source de contamination, les traitements à la chaux ou la présence d'une irrigation ne semblent pas influencer la durée de survie de *Map* ($P > 0,05$) dans le sol.

De même, lors d'une autre étude réalisée en 2000, les auteurs n'ont pas mis en évidence de lien significatif entre le type de sol ou son pH et la prévalence de la paratuberculose (Reviriego, F.J. *et al.* 2000).

Les sols humides, acides (notamment à cause des mécanismes reliant le pH du sol à la disponibilité du fer), décalcifiés, déphosphorés ou à faible teneur en potasse sont pourtant encore considérés à ce jour comme des facteurs de risque pour la paratuberculose, car ils favorisent la résistance du bacille dans le sol.

Il semble donc que des études supplémentaires sont nécessaires et attendues pour clarifier le rôle du sol dans le cycle épidémiologique de la paratuberculose.

A contrario, la présence d'obscurité au sol représente un facteur de variation majeur pour la survie de *Map*, et ce dans la majorité des études. De ce fait, par l'obscurité produite au sol, la hauteur d'herbe peut jouer un rôle non négligeable dans la persistance des mycobactéries.

Comment expliquer que la présence d'obscurité favorise la survie de *Map* ? L'humidité n'apparaissant pas comme un facteur influençant la survie de *Map*, les différences entre zones ombragées ou exposées au soleil, incluent les radiations solaires et les amplitudes de variation de la température ; alors que *Map* ne semble pas particulièrement résistant aux radiations UV, elles ne peuvent pas pénétrer au sein des amas de matières fécales, et ne permettent donc qu'une désinfection partielle en surface. Les variations de température semblent plus donc plus capables d'influencer la survie de *Map* que l'exposition aux

radiations solaires : l'effet de l'ombre est ainsi principalement du à une diminution des écarts de température.

Lors d'une étude portant sur le lien possible entre les types de sol et l'émergence de cas cliniques de paratuberculose, la présence de limon ou de sable dans des sols dits « gras » semble favoriser la présence, ainsi que la persistance de *Map*. (Ward, M.P. *et al.* 2004).

I.2.4.1.2. Phénomène de dormance

La dormance se définit comme l'état permettant à une bactérie non sporulée de survivre sans avoir recours à la réplication. Ce mécanisme est génétiquement programmé, réversible, et induit par des conditions environnementales défavorables (classiquement quand un nutriment essentiel à la croissance devient limitant). La preuve de la dormance est l'impossibilité cultiver l'organisme tant que l'environnement reste défavorable, alors que dans un milieu favorable, les cellules reprennent la capacité à se diviser et deviennent détectables.

A ce jour, cette propriété phénotypique est suspectée chez *Map*, mais n'a pas encore été démontrée (Whittington, R.J. *et al.* 2004).

Cette hypothèse est liée aux phénomènes de réactivation (aucune culture positive pendant plusieurs semaines, puis des prélèvements positifs consécutifs), ou de forte variations dans les comptages de pathogènes viables.

Des réplifications sporadiques dans l'environnement pourraient être une autre explication, , mais elles sont fort peu probables, d'autant plus qu'une répllication environnementale n'a jamais été décrite pour *Map* .

Chez les espèces mycobactériennes à croissance rapide, la dormance est associée à l'expression de gènes spécifiques. Par exemple, la forte diminution d'oxygène dans des cultures de *M. smegmatis*, *M. bovis* et *M. tuberculosis* entraîne un état de dormance ainsi qu'une résistance accrue aux antibiotiques.

Or récemment, une protéine *Dps-like* (conférant une protection en se liant à l'ADN lors de stress oxydatif ou nutritionnel chez certaines bactéries) a été identifiée chez *M. smegmatis*, et une séquence homologue a été trouvée dans le génome de *Map* (Figure 5).

Figure 5 : séquence Dps-like chez *M. smegmatis* et son homologue chez *Map*.

```

M.ptb 1 MSEFTIPGLTDKQAARLTELQKQLSTYNDLHLTLKHIHWNVVGPNFIGV 50
|. ||||| |-.| |. . : ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
M.smeg 1 MTSFTIPGLSDKKASDVADLLQKQLSTYNDLHLTLKHVHWNVVGPNFIGV 50

M.ptb 51 HEMIDPQVEAVRGFADDVAERIAALGASPOGTPGAI IKDRSWDDYSVGRD 100
||||| ||||| ||||| :||| ||||| || || || ||||| ||||| . ||||| ||
M.smeg 51 HEMIDPQVELVRGYADEVAERIAATLGKSPKGTGPAI IKDRTWDDYSVERD 100

M.ptb 101 TVQAHLAALDLVYNGVIEDIRQYIDETDELQVTDLLIGQAAQLEKFPW 150
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
M.smeg 101 TVQAHLAALDLVYNGVIEDTRKSIEKLEDLDLVSQDLLIAHAGELEKFPW 150

M.ptb 151 FVRAHLESAGGQLAHKSKSTERAAAQSARGKS* 183
||||| ||||| ||||| |-.| ||||| : || || ||
M.smeg 151 FVRAHLESAGGQLTHEGQSTEGKAADKARRKSA 183

```

FIG. 8. Alignment of the amino acid sequences for the Dps-like protein from *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. ptb*) and Dps from *M. smegmatis* (*M. smeg*) (GenBank accession no. AY065628). Amino acid residues in boldface and underlined are reported to be involved in the DNA binding signature (15). Symbols: bar, identical; colon, highly related; period, more distantly related; no symbol, unrelated.

Un second élément génétique, RelA (Figure 6), qui est activé lors de la réponse de *M. tuberculosis* à la disparition de la source de carbone ou d'acides aminés, est également présent chez *Map*.

Toutefois, lors des diverses études s'intéressant au phénomène de dormance chez *Map*, les facteurs de réactivation n'ont pas pu être identifiés.

Figure 6 : séquence RelA chez *Mycobacterium tuberculosis* et RelA-like chez *Map*.

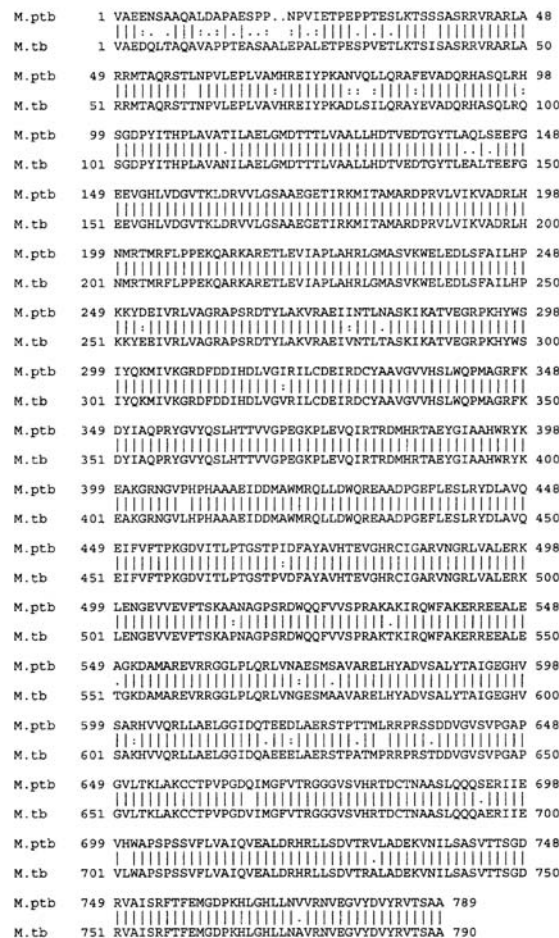


FIG. 9. Alignment of the amino acid sequences of the RelA-like element from *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. ptb*) and RelA from *M. tuberculosis* (*M. tb*) (*relA* gene accession no. Rv2583c, TubercuList Web Server, <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Symbols: bar, identical; colon, highly related; period, more distantly related; no symbol, unrelated.

I.2.4.2. Persistance dans les liquides et les sédiments

Les mycobactéries non tuberculeuses sont connues (et celles du complexe *Mycobacterium avium* en particulier) pour leur très bonne adaptation aux écosystèmes aquatiques, que ce soit en eau douce ou en eau salée, ainsi qu'aux sols humides (Collins, C.H. *et al.* 1984).

La persistance de *Map* dans l'eau et les sédiments fut documentée par Whittington *et al.* à plusieurs reprises.

- En 2003 (Whittington, R.J. *et al.* 2003), lors de la recherche de *Map* (paragraphe I.2.4.1.) effectuée dans des sols, eaux et sédiments provenant de zones fréquentées par des troupeaux (ovins et caprins) atteints de paratuberculose clinique, sur 17 échantillons d'eau et 17 échantillons de sédiments issus des 6 fermes infectées, seulement 1 échantillon d'eau et 1 échantillon de sédiment furent positifs en culture.

Un échantillon de sédiments a été positif 12 mois après déstockage (sur 96 prélèvements d'eau, 90 sédimentaires et 93 à partir de sols).

- Whittington *et al.* documentèrent également la persistance de *Map* en milieu aquatique en fonction de la luminosité ambiante.

La survie observée dans l'eau et/ou les sédiments fut supérieure à 48 semaines à l'ombre, et de 36 semaines dans des lieux exposés à la lumière.

De plus, la survie de *Map* apparaît plus longue, de 12 à 36 semaines, dans les sédiments que dans la colonne d'eau (au cours de cette même expérience, la survie dans les sols ou dans des matières fécales, dans les mêmes conditions d'obscurité, ne fut que de 12 semaines) (Whittington, R.J. *et al.* 2005).

Les auteurs expliquent la plus grande persistance de *Map* en milieu aquatique (dans le cadre de leur étude) par des amplitudes de température moins grandes dans ce milieu.

Dans ces travaux, le phénomène de dormance en milieu aquatique est également suspecté.

- D'autres études portant sur la persistance d'une souche bovine de *Map* en milieu artificiel furent publiées : entre 6 et 18 mois respectivement dans de l'eau potable ou de bassin, et environ 15 mois dans l'eau distillée.

- Une étude rapporte également une durée de persistance extrême de 841 jours dans le microcosme d'eau de lac (Pickup, R.W., *et al.* 2005)

Devant la forte persistance de *Map* en milieu aquatique, des recherches supplémentaires sur la biologie de l'organisme dans l'eau sont nécessaires et attendues.

Cependant, pour limiter la contamination, il paraît judicieux de conseiller aux éleveurs, de limiter l'abreuvement du bétail dans des points d'eau éventuellement contaminés.

En effet, pendant les campagnes d'éradication, la survie de *Map* en milieu aquatique pourrait être un réel problème, outre le risque de transmission entre fermes.

Toutefois, à l'heure actuelle, bien que le temps de persistance mesuré varie fortement en fonction de la source de contamination (naturelle ou expérimentale, et relié au taux de contamination initial), et du degré d'obscurité, certaines précautions peuvent être conseillées aux éleveurs, couvrant la grande majorité des situations à risque :

- restreindre l'accès aux cours d'eau si l'endroit est/a été fréquenté par des troupeaux infectés dans les 12 derniers mois.

- la mise en suspension des sédiments peut entraîner un plus fort niveau de contamination de la colonne d'eau (puisque *Map* semble survivre plus longtemps dans les sédiments). Pour cette raison, il est préférable d'abreuver les animaux à partir de l'eau collectée dans des citernes et dans des abreuvoirs, plutôt que de laisser les animaux consommer des eaux troubles ou de les laisser entrer dans l'eau pour s'abreuver et donc mettre en suspension les sédiments.

I.2.4.3. Persistance dans les matières organiques

En 1977, Jörgensen rapportait que dans des conditions anaérobies, *Map* peut survivre dans des bouses de bovins pendant 252 et 98 jours, lorsqu'elles sont stockées respectivement à 5 et 15°C (Jörgensen, J.B. 1977).

Par la suite, la persistance de *Map* a été documentée pour les différents procédés de stockage et de traitement des déjections bovines : le compostage, le fumier accumulé en tas, ou le lisier stocké dans une fosse.

Dans les conditions usuelles, le compostage permet d'exposer les germes à une température de 55°C, le fumier accumulé à une température de 25°C (méthode considérée comme un compostage à basse température), alors que dans le lisier les germes sont à température ambiante en condition anaérobie.

Dans l'étude de Grewal *et al.*, le compost et le fumier accumulé furent maintenus pendant 56 jours dans le mélange initial.

Map a été détecté à J0 dans les trois types de stockage ; puis est devenu indétectable par culture standard (et vérification de la culture par PCR *IS900*) pour les 3 procédés envisagés, et ce dès J3 et J7.

Map fut de nouveau détecté dans le lisier à J.14, J.28 et J.56, mais resta indétectable dans les 2 autres types de stockage (Grewal S.K. *et al.* 2006),

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats, notamment pour le stockage sous forme liquide : une des principales résiderait dans l'hétérogénéité des prélèvements, due à la tendance de *Map* à former de larges agrégats (ou *clump*)., le lisier fut conservé dans la fosse pendant 175 jours.

Les matières fécales étudiées furent inoculées par *Map* de façon à atteindre une concentration de 10^6 UFC/g

Après 3 jours de stockage sous forme de compost à 55°C ou de fumier à 25°C, *Map* n'a pu être isolé en culture dans aucun des deux traitements ; la température n'est donc pas le seul facteur réduisant la persistance de ces organismes.

Néanmoins de l'ADN de *Map* fut détecté tout au long des 56 jours de l'expérience, et ce dans les trois types de traitements, et resta détectable dans la fosse à lisier jusqu'à J175. Cela amène à suggérer 3 possibilités :

- soit l'ADN mis en évidence provenait de mycobactéries non viables,

- soit celles-ci étaient présentes mais en dessous des seuils de détection de l'isolement bactériologique.
- soit les organismes de *Map.* étaient viables, mais non-cultivables à cause des conditions physico-chimiques ou des compétitions microbiennes mises en jeu.

La survie des microorganismes pathogènes dans les déjections animales dépend de nombreux facteurs, notamment la température, le pH, le taux d'humidité, la composition physique du matériel composté, les caractéristiques du sol sur lequel le compostage est réalisé et les compétitions possibles entre les microorganismes présents.

Dans le cadre strict de la lutte contre la paratuberculose, le compostage ou l'accumulation sous forme de fumier semblent des procédés à favoriser par rapport à l'utilisation d'une fosse à lisier.

Le fumier et/ou le lisier étant habituellement épandus sur les terres, voire les pâtures, il est absolument nécessaire de tenir compte de ces données dans les plans de lutte envisagés contre la paratuberculose, et diminuer la contamination des eaux de ruissellement par les effluents d'élevage.

Il est important de noter qu'à ce jour, aucune limite maximale quand à la survie de *Map* dans l'environnement n'a été établie, de même que dans les matières organiques ; de nombreuses incertitudes demeurent encore.

En annexe, est fourni un tableau récapitulatif des temps de survie constatés pour *Map*, (souche bovine), dans différents substrats naturels exposés à des conditions imitant un environnement naturel, ou dans différents modèles de laboratoires (Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J. *et al.* 2004).

I.2.4.4. Persistance chez les invertébrés et protozoaires

I.2.4.4.1. Invertébrés

Bien que *Map* soit classifié comme étant un pathogène parasite obligatoire des animaux, il a déjà été isolé à partir de larves de nématodes et autres invertébrés (Fischer, O. *et al.* 2001 ; Whittington, R.J. *et al.* 2001).

Map fut ainsi isolé chez des larves de nématodes issues de moutons élevés dans des conditions naturelles (Whittington, R.J, *et al.* 2001), mais également chez des larves d'*Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis* issues de cultures fécales expérimentalement contaminées par *Map* (Lloyd, J.B. *et al.* 2001).

Le développement des larves de nématodes dans les fèces, qui peuvent contenir jusqu'à 10^8 *Map* viables/g, explique la forte probabilité que leur surface soit exposée et contaminée par *Map*. En ce sens, les résultats de Whittington *et al* suggèrent que la contamination par *Map* est plus liée à une contamination de surface plutôt qu'à une contamination des tissus internes, notamment du tube digestif de la larve (Whittington, R.J, *et al.* 2001).

Dans la question de la possible intervention des nématodes dans l'épidémiologie de la paratuberculose, il peut être intéressant de noter que les conditions environnementales favorables aux larves de nématodes de troisième âge sont également favorables à la survie de

Map (c'est-à-dire une protection contre les radiations solaires et la chaleur, la présence d'humidité).

De plus, ces larves ont la capacité de traverser la muqueuse gastro-intestinale, favorisant ainsi la pénétration de *Map* dans les tissus (la dose infectante nécessaire serait alors moindre).

Les nématodes pourraient donc intervenir comme vecteurs passifs de paratuberculose, et ainsi augmenter l'efficacité de la transmission de l'infection.

D'autres invertébrés peuvent également servir de vecteurs passifs : c'est notamment le cas de *Calliphora vicina* et de *Lucilia sericata* (diptères).

Ces invertébrés peuvent se contaminer par les sécrétions, excréments et tissus de cadavres animaux, principalement lorsqu'ils se nourrissent sur des déchets d'abattoir, ou lors de la ponte sur ces mêmes déchets.

Après contamination expérimentale de larves de stade 2 de ces invertébrés (ingestion de déchets d'abattoir contaminés), *Map* fut détecté (méthode RFLP) chez les larves de *C. vicina* aux jours quatre et 11, et chez les larves de *L. sericata* au jour quatre après l'infection.

Néanmoins, pour les larves contaminées, aucune mycobactérie ne fut isolée à partir des pupes, adultes ou exuvies (il n'y a donc pas de transmission verticale ou entre les différents stades).

Chez des insectes infectés expérimentalement au stade adulte (consommation d'une solution contaminée par *Map*), l'analyse de la distribution de *Map* deux jours après infection révèle que la majorité des germes se retrouve à partir de l'abdomen et de la tête, alors qu'on en retrouve peu au niveau du thorax et des ailes, et pas du tout sur les pattes.

Dans cette même étude, des mouches naturellement contaminées furent capturées jusqu'à 150 mètres du point contaminant (or ces diptères peuvent parcourir plusieurs kilomètres à partir de la source de nourriture). (Fischer, O.A. *et al.* 2004).

Il semble également exister un risque par la consommation d'insectes contaminés chez les oiseaux, qui transportent alors les mycobactéries sur des distances très grandes, outre un effet de concentration.

Ainsi les insectes, tant pour les formes adultes que larvaires, doivent être considérés comme des vecteurs potentiels, et pourraient ainsi être, bien que cette hypothèse demeure très peu probable, incriminés dans l'émergence clinique de cas de paratuberculose dans un troupeau auparavant indemne ; cela doit notamment être pris en compte sur les sites d'abattage d'animaux infectés, bien que ce risque soit très faible.

Map fut également isolé à partir des tissus et des fèces de vers de terre (*Lumbricus terrestris*) deux jours après le dernier contact avec des bouses contaminées (Fischer, O.A. *et al.* 2003b). Toutefois, les auteurs admettent que les vers de terre n'apporteraient qu'une faible contribution (malgré leur importance parmi la faune des sols, jusqu'à 60% de la biomasse souterraine) à la survie et à la transmission de *Map* dans les conditions naturelles.

I.2.4.4.2. Protozoaires

Les protozoaires sont reconnus comme les hôtes d'un certain nombre de bactéries pathogènes ; ils permettent une forte répllication des bactéries au sein des vacuoles, une

persistance sous forme de kystes, et demeurent ainsi protégés de certains désinfectants chimiques tels que le chlore.

De telles interactions existent également entre *Map* et certains protozoaires environnementaux (Whan, L. *et al.* 2006).

Map montre une forte persistance dans l'environnement, bien qu'il soit considéré comme incapable de s'y répliquer (rappelons que cette phase nécessite la mycobactine, présente uniquement chez ses hôtes animaux à l'état naturel). Ainsi, *Map* pourrait augmenter sa longévité dans l'environnement grâce à sa capacité à survivre à l'ingestion par des protozoaires, qui sont habituellement bactériophages.

Le mécanisme de survie, à priori semblable à celui d'autres bactéries (telles que *Legionella*, *Listeria*, ou bien encore *Chlamydia*), réside en une interférence dans la fusion entre les lysosomes et les vacuoles contenant la bactérie.

L'intérêt de caractériser ces interactions repose notamment sur la protection engendrée par cette localisation intracellulaire, notamment vis à vis des procédés de chloration utilisés dans les opérations de traitement des eaux de surface (2µg de chlore/ml), ou les procédés de nettoyage des végétaux comestibles.

L'étude citée ci-dessus met en évidence que la survie et la multiplication de *Map* chez *Acanthamoeba spp.* est tout à fait possible dans les conditions naturelles, les cellules de mycobactéries étant présentes dans des vacuoles au sein des protozoaires.

De plus, les cellules de *Map* ingérées par ces protozoaires sont plus résistantes à l'inactivation par le chlore que des cellules libres, et ce quelque soit le niveau de chloration ou le temps d'exposition (Whan, L. *et al.* 2006).

Pour mesurer les conséquences de ces phénomènes, il ne faut pas omettre que les protozoaires sont ubiquistes dans divers habitats naturels tels que l'eau et les sols, et plus particulièrement dans ceux comportant des matières organiques, comme par exemple les déjections animales.

Autre élément à prendre en compte : certains protozoaires pathogènes, tels *A. castellanii*, ont la capacité de traverser l'épithélium intestinal, et pourrait donc entraîner avec eux les bactéries phagocytées, tels des « chevaux de Troie », permettant ainsi aux mycobactéries de se soustraire aux défenses immunitaires primaires de l'hôte.

En outre, une fois inclus dans des protozoaires, l'augmentation de résistance de *Map* vis à vis d'autres stress chimiques est tout à fait plausible, étant donné que la co-culture de *Map* et de *A. castellanii* réduit l'efficacité des antibiotiques tels que la rifabutine, l'azithromycine et la clarithromycine.

I.2.5. Résistance du bacille

De même que les autres mycobactéries, *Map* possède une épaisse membrane cellulaire constituée d'une double couche contenant 60% de lipides ; cela lui confère les propriétés d'acido-alcoolo-résistance, un caractère hydrophobe mais aussi une résistance accrue aux agents chimiques et à divers traitements physiques.

I.2.5.1. Résistance aux agents chimiques

L'agent de la paratuberculose résiste à la plupart des désinfectants usuels, mais reste toutefois sensible au lait de chaux à 10%, à l'hypochlorite de soude (eau de javel) à 10%, au formol à 5%, au sulfate de cuivre ou de fer à 5%, au phénol à 1%, au crésol à 2-3%, ou bien encore à l'orthophénylphénate de sodium.

Il est à noter que dans les conditions naturelles, l'humidité et un pH acide lui sembleraient favorables (existence de données contradictoires).

En revanche, un faible taux d'humidité, les UV, un pH alcalin et l'urée (persistance limitée à 7 jours dans l'urine, (Annexe 1) lui sont défavorables.

Les caractères de sensibilité/résistance de *Map* vis-à-vis des molécules antibiotiques seront abordés ultérieurement.

I.2.5.2. Résistance de *Map* dans les liquides

I.2.5.2.1. Résistance de *Map* à la stérilisation dans le lait

Map est reconnu comme étant plus résistant à la chaleur que les autres mycobactéries (notamment *Mycobacterium bovis*, organisme pour lequel les conditions de temps et de température de pasteurisation ont été déterminés) ; certains auteurs considèrent ainsi qu'une faible quantité de bacilles viables peuvent occasionnellement survivre dans le lait commercialisé, notamment après traitement par pasteurisation commerciale, indiquant que *Map* peut supporter des températures supérieures à 60°C (Ellingson, J.L.E. *et al.* 2005).

La polémique vient principalement du fait que *Map* fut isolé (10 échantillons sur 567) en Grande-Bretagne à partir de lait pasteurisé (Grant, I.R. *et al.* 2002).

Depuis, certaines industries laitières ont modifié leur protocole de pasteurisation, appliquant une température de 72°C pendant 25 secondes, au lieu de 15 sec ; néanmoins la survie de *Map* fut mise en évidence pour les deux temps de chauffage.

Les facteurs contribuant à la survie de *Map* dans le lait lors du processus de stérilisation n'ont pas été totalement élucidés ; ils peuvent inclure le niveau de contamination initial (qui serait relié au degré de contamination fécale lors de la traite), la capacité de *Map* à former de larges agrégats de cellules.

Concernant le niveau de contamination initial, la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que **la contamination d'un lait de tank peut au maximum atteindre 4 à 5 log UFC/ml**. Cette teneur est principalement due à une contamination fécale, et à une moindre mesure aux bactéries excrétées par la mamelle (rappelons que des échantillons de lait obtenus de manière stérile chez neuf vaches en phase sub-clinique de paratuberculose ont montrés une

concentration en *Map* variant de 2 à 8 UFC/ml (soit de 0,3 à 0,9 log UFC/ml) (Sweeney, R.W. *et al.* 1992).

De très nombreux moyens de décontamination du lait ont été étudiés et mis en oeuvre, de la pasteurisation à l'utilisation d'une forte pression hydrostatique à température ambiante, en passant par l'utilisation de champs électriques pulsés.

I.2.5.2.1.1. Décontamination par application d'une forte pression hydrostatique à température ambiante (Lopez-Pedemonte, T., Sevilla, I., Garrido, J.M. *et al.* 2006)

L'étude fut menée sur deux souches distinctes de *Map* (3644/02 et ATCC 19698, toutes deux issues de bovins), à la dose de 6 log CFU/ ml. Les conditions étudiées étaient des températures de 5 ou 20°C, un temps d'exposition de 10 min et enfin des niveaux de pression variant de 300 à 500 MPa.

La diminution mesurée de la concentration de *Map* fut proportionnelle au niveau de pression utilisé ; les comptages obtenus à 5°C étaient identiques à ceux obtenus à 20°C.

Il faut toutefois noter que des différences significatives ont été observées en fonction de la souche.

Il fut observé une réduction d'environ 4 log CFU/ml après un traitement à 500Mpa, ce qui est comparable aux résultats obtenus avec la plupart des traitements thermiques.

Cette valeur suggère donc la possibilité d'inactiver *Map* par cette méthode quand sa concentration dans le lait est inférieure à 4 log CFU/ml. Ceci permet d'appliquer la méthode à du lait réfrigéré, et donc de conserver de bonnes qualités nutritionnelles et organoleptiques, ou bien encore de l'appliquer à du colostrum en préservant la qualité de celui-ci.

I.2.5.2.1.2. Décontamination par pasteurisation.

Partant du constat de la plus grande tolérance thermique de *Map* par rapport aux autres mycobactéries pathogènes, la valeur D fut déterminée pour les souches bovines de *Map* dans du lait de tank (Keswani, J. *et al.* 1998).

- A 55°C, l'inactivation thermique observée est minimum tant sur les germes isolés que sur les germes en agrégats.
- A 60°C, D est de 8,6 à 11 min pour les germes en agrégats ; de 8,2 à 14,1min pour les germes isolés.

Une deuxième étude obtint les résultats suivants ;

$D_{62^{\circ}\text{C}} = 228,8 \text{ sec}$; $D_{65^{\circ}\text{C}} = 47,8 \text{ sec}$; $D_{68^{\circ}\text{C}} = 21,8 \text{ sec}$ et $D_{71^{\circ}\text{C}} = 11,67 \text{ sec}$

La valeur Z dans le lait étant de 7,11°C.

En utilisant ces valeurs, le temps estimé pour éliminer 100% des germes contenus dans un lait contenant 10^6 UFC/ml serait de 978 sec à 62°C, 234 sec à 65°C, 120 sec à 68°C et 72 sec à 71°C (Nackmoon, S. *et al.* 1998).

Au cours de cette même étude, les valeurs D des germes isolés ou en amas n'étaient pas significativement différentes, malgré une tendance à l'inactivation plus rapide des germes isolés (ou *en amas* de petite taille).

I.2.5.2.1.2.1. Efficacité et sources de variation de la pasteurisation HTST / UHT (72°C pendant 15 secondes).

Les résultats obtenus par les différents auteurs sur ce procédé divergent quant à son efficacité.

Ces divergences peuvent en partie être expliquées par différents points : choix du matériel de pasteurisation, méthodes de détection et milieux de culture utilisés, séparation ou non des amas, contaminations initiales enregistrées, variations de la sensibilité thermique des différentes souches de *Map* utilisées, conditions d'utilisation de souches fraîchement isolées ou adaptées au laboratoire.

- Lors de l'étude de Mc Donald *et al.*, différents niveaux de contamination initiale par *Map* furent étudiées (de 10^3 à 10^4 organismes/ml), le pasteurisateur utilisé étant un appareil à capacité de 3000 l/h, avec flot turbulent continu, en grande partie équivalent à un pasteurisateur de type commercial.

Les températures d'étude furent 72, 75 et 78°C, et des temps d'application de 15, 20 et 25 secondes.

La méthode de contrôle (mise en culture, avec un procédé de décontamination simplifié) montre une limite de détection de un organisme pour 10 ml de lait.

La pasteurisation quelles que soient les températures et les durées d'application testées ont permis une réduction supérieure à 6 log dans 85% des essais (aucun organisme viable de *Map* détecté dans 17 des 20 essais), et une réduction supérieure à 4 log dans 14% des essais (lors de 3 tests [72°C pendant 15 sec, 75°C pendant 25 sec et 78°C pendant 15 sec], quelques rares organismes (de 0,002 à 0,004 CFU/ml) furent détectés).

Map fut ainsi isolé dans 6,9% des échantillons (10 sur 144) (Mc Donald, W.L. *et al.* 2003),

- L'intérêt d'une homogénéisation initiale du lait fut notamment étudié par Grant *et al.* Lors de cette étude, le pasteurisateur utilisé était de type commercial, la contamination initiale allant de 10^1 à 10^5 UFC/ml de lait, avec ou sans homogénéisation.

96,7% des échantillons ont été décontaminés intégralement par la pasteurisation, utilisée seule ou en combinaison avec une homogénéisation initiale.

Des organismes de *Map* viables furent mis en évidence à partir de 27 échantillons sur 816 (3,3%). Toutefois, lors de décontamination imparfaite, quelques rares bacilles de *Map* ont été mis en évidence (entre 10 et 20 CFU/150ml).

La réduction de *Map* observée variant entre 4,0 et 5,2 log, avec ou sans homogénéisation initiale du lait (supérieure à 5 log dans 96,7 % des cas).

La plupart des cultures positives qui ont été obtenues dans cette étude correspondent à une température de pasteurisation de 72,5°C, qui correspond pourtant à la température légale

minimum de pasteurisation ; sinon, elles proviennent de lait pasteurisé sans homogénéisation préalable.

L'homogénéisation permet d'augmenter l'efficacité de la décontamination du lait vis-à-vis de *Map* (les agrégats pouvant contenir plus de 10 000 bactéries dans le lait).

Néanmoins, aucune différence significative ne ressort de la comparaison des différents procédés d'homogénéisation (homogénéiseur conventionnel à pression, microfluidiseur ou traitement ultrasonique) (Grant, I.R. *et al.* 2005b).

Cette étude révèle que des ajustements de la température de pasteurisation ou du temps de chauffage uniquement, ne sont pas suffisants pour assurer une inactivation complète de *Map* dans certains cas.

Par contre, la combinaison de la pasteurisation avec des procédés tels que l'homogénéisation permet de maximiser la réduction d'organismes viables de *Map*.

I.2.5.2.1.2.2. Efficacité et sources de variation de la pasteurisation à basse température (63°C pendant 30 minutes).

Dans ce cas non plus, la pasteurisation à basse température (LTH) (Grant, I.R., Ball, H.J., Neill, S.D. *et al.*, 1996) (63C pendant 30 min) ne permet pas de décontaminer totalement le lait de tank ; les résultats apparaissant similaires à ceux obtenus par la pasteurisation UHT

I.2.5.2.1.2.3. Application particulière au colostrum

Pour la lutte contre la paratuberculose en élevage, l'applicabilité du procédé de pasteurisation au colostrum a été vérifiée. Le résultat de la pasteurisation a été étudié sur du colostrum infecté expérimentalement, ainsi que ses possibles effets délétères sur la teneur en immunoglobulines G.

La pasteurisation a été réalisée à une température de 63°C appliquée pendant 30 minutes.

La recherche de *Map* dans le colostrum préalablement pasteurisé a été réalisée par une mise en culture pendant une durée de 16 semaines. De plus, la concentration en IgG fut mesurée avant et après pasteurisation par méthode radioimmunologique.

Il apparaît que la croissance de *Map* à partir du colostrum est ralentie après pasteurisation mais pas complètement éliminée.

La croissance de *Map* a été mise en évidence dans deux prélèvements (parmi 18 testés) à partir de colostrum pasteurisé.

La concentration moyenne en IgG était de 44,4g/l pour le colostrum avant pasteurisation et de 37,2g/l une fois pasteurisé, soit une diminution de 12,3%. Les colostrums de très bonne qualité (sup. à 48g/l) subissent une plus forte baisse (P=0,002).

Donc en dépit de la diminution des IgG qui a été constatée (permettant tout de même un transfert correct de l'immunité passive), la pasteurisation du colostrum permet de diminuer le risque de transmission de la paratuberculose, sans toutefois éliminer totalement les bacilles de *Map* (Meylan, M. *et al.* 1996).

Godden *et al.* ont obtenus des résultats similaires au cours de leur étude sur la pasteurisation du colostrum (Godden, S. *et al.* 2006).

Les échantillons ont été ici pasteurisés à 60°C pendant 120 min, dans un pasteurisateur disponible commercialement pour une utilisation dans les élevages.

En utilisant ce protocole, aucun effet délétère n'a été observé sur la teneur en IgG (pré : 60,5g/l, post : 59,1g/l) du colostrum.

Lors de cette étude, après une inoculation initiale de 10 UFC/ml, aucune culture n'a été positive après 60 min à 60°C.

Les auteurs estiment, dans les deux études, que ce système est suffisant dans la majorité des situations en élevage.

I.2.5.2.2. Résistance à la décontamination de l'eau

L'efficacité d'élimination et/ou d'inactivation de *Map* dans l'eau destinée à la consommation humaine (que ce soit par la filtration sur le sable ou la chloration) n'a été que peu documentée à ce jour. Néanmoins, une étude a d'ores et déjà démontré que le niveau de chloration habituellement utilisé pour le traitement des eaux potables ne permet qu'une réduction d'environ 2 log₁₀ du nombre de *Map* viables présents dans l'eau (Whan, L. *et al.* 2001).

Aucun traitement ne semble permettre d'assurer une décontamination efficace, à l'exception de l'ionisation.

II. METHODES DE DIAGNOSTIC ET DE DEPISTAGE DE LA PARATUBERCULOSE

Dans le cadre de la recherche de la paratuberculose dans un élevage, le diagnostic épidémiologique constitue une première étape.

Un diagnostic différentiel cohérent permettra d'éliminer un certain nombre d'affections qui pourraient être confondues avec la paratuberculose; le diagnostic nécropsique pourra être utilisé pour confirmer la suspicion.

Toutefois, dans le cas de la paratuberculose, les examens de laboratoire occupent une place prépondérante que se soit pour confirmer ou infirmer une infection à *Map*, ou bien encore pour réaliser le dépistage au sein des cheptels.

II.1. Diagnostic épidémiologique

La paratuberculose peut-être suspectée chez les bovins, ovins ou caprins, et cela quel que soit le type d'élevage. Comme nous l'avons vu précédemment, la maladie apparaît le plus souvent de manière sporadique, mais peut également se présenter sous forme enzootique.

L'incidence de la forme clinique est maximale chez les jeunes adultes, après la première mise bas, voire la seconde. Toutefois, il arrive que des bovins déclarent la forme clinique après l'âge de 10 ans.

Tout ruminant domestique adulte présentant une diarrhée incoercible, avec le plus souvent une conservation de l'appétit, associée à un amaigrissement progressif, devra être considéré comme suspect de paratuberculose.

Signalons toutefois la rareté de la diarrhée chez les ovins, chez qui l'amaigrissement est le signe majeur

II.1.1. Diagnostic différentiel (cas particulier des bovins)

Toutes les affections qui peuvent provoquer une diarrhée chronique accompagnée ou non d'amaigrissement doivent être envisagées. Le tableau suivant, qui n'est pas exhaustif, regroupe les principales affections entrant dans le diagnostic différentiel de la paratuberculose. (Pétrié, L., 1991, Brugere-Picoux, J., 1987)

Tableau 3 : diagnostic différentiel des diarrhées chroniques chez les bovins.

Maladies	Symptômes évocateurs	Epidémiologie	Autres signes cliniques	Diagnostic
Paratuberculose	- diarrhée profuse et incoercible - amaigrissement	- sporadique ou enzootique - bovins > 2 ans	- chute de la production - anémie	- signes cliniques - examens de laboratoire
Oestertagiose	- diarrhée profuse - amaigrissement	- enzootique - plutôt animaux jeunes - automne ou hiver	- appétit diminué - évolution relativement aiguë	- coproscopie - pepsinogène élevé - contexte épidémiologique
Distomatose	- Diarrhée - amaigrissement - oedèmes déclives	- animaux adultes - pâturage en zone humide		- coproscopie - sérologie
Thrombose de la veine cave caudale, abcès hépatiques	- diarrhée - amaigrissement - appétit diminué	- sporadique - plutôt animaux âgés	-hémoptysie	- signes cliniques
Amyloïdose rénale	- diarrhée - oedèmes déclives	- sporadique - bovins > 5 ans	- gros reins - appétit diminué - signes urinaires	- Palpation transrectale - urémie et créatininémie élevées
Paramphistomose larvaire	- diarrhée profuse et incoercible, noire à verte	- enzootique - printemps ou automne		-coproscopie
Carence en cuivre et/ou en sélénium et vitamine E	- diarrhée - amaigrissement	- sporadique ou enzootique	- anémie	- dosage - diagnostic thérapeutique (réponse au traitement)
Pyélonéphrite chronique	- amaigrissement - diarrhée - hyperthermie	- bovins adultes dans le trimestre post-partum.	- dysurie	- palpation transrectale
Intoxications (mercuriale, prêle, renoncule, molybdène)	- non spécifique	- aliments	- signes associés, en particulier neurologiques	- anamnèse - prélèvements
Acidose chronique	- odeur acide de la diarrhée	- erreur dans le plan de rationnement	- pousse anormale des sabots - mammites..	- mesure de pH ruminal - vérification du plan de rationnement

Les affections à l'origine d'une diarrhée aiguë, telles que la salmonellose, la dysenterie d'hiver, le BVD, l'acidose aiguë ou bien encore certaines intoxications aiguës n'ont pas été incluses dans le diagnostic différentiel de la paratuberculose.

II.2. Diagnostic nécropsique

Nous ne détaillerons pas cet aspect du diagnostic. Il repose sur l'observation de lésions intestinales et ganglionnaires, ainsi que sur la présence d'une hydrocachexie dans la plupart des cas.

Une réserve doit être émise quant à la valeur des observations macroscopiques, puisqu'elles n'apparaissent que très tardivement dans l'évolution clinique de la paratuberculose, mais surtout que l'intensité des symptômes n'est pas bien corrélée avec les lésions qui sont observées lors de l'autopsie.

Il apparaît donc clairement que le recours à un examen de laboratoire est nécessaire pour obtenir un diagnostic de certitude, et permettre un dépistage efficace de la paratuberculose

II.3. Examens de laboratoire

La paratuberculose étant une maladie dont l'évolution est lente, les informations obtenues par les diverses techniques vont évoluer au cours du temps. Il est absolument nécessaire de garder à l'esprit le caractère évolutif de la maladie et de la réponse immunitaire qu'elle provoque pour une utilisation raisonnée et optimale de la palette des tests disponibles.

Les différentes méthodes utilisables peuvent être réparties en 2 groupes :

Tout d'abord les techniques dites **directes** qui permettent la mise en évidence du bacille : les méthodes de bactérioscopie, d'histopathologie, de culture fécale ou tissulaire, ainsi que les différentes techniques de PCR.

Ensuite viennent les techniques dites **indirectes** qui permettent de mettre en évidence la réaction immunitaire de l'hôte face à l'infection paratuberculeuse et les lésions qu'elle provoque ; on distingue notamment les méthodes mettant en évidence la **réaction immunitaire à médiation cellulaire** (test cutané intradermique ou test à l'interféron-gamma, test d'inhibition de la migration des macrophages, ou encore de transformation lymphoblastique), ainsi que celles mettant en évidence la **réaction immunitaire à médiation humorale** (sérologie ELISA indirecte, fixation du complément et test d'immunodiffusion en gelose). Enfin l'histopathologie permet de mettre en évidence les modifications de la composition cellulaire des tissus provoquées par l'infection.

Pour chaque technique, nous mettrons en avant les principales caractéristiques et l'utilisation pour le dépistage.

II.3.1. Techniques directes

II.3.1.1. Bactérioscopie

Cette méthode repose sur la mise en évidence du caractère acido-alcool résistant de *Map*.

II.3.1.1.1. Description et mise en oeuvre

Le principe est la recherche de bacilles paratuberculeux en microscopie après étalement sur une lame de verre à partir d'un prélèvement de fèces. Cet étalement est coloré de manière à mettre en évidence la résistance de la coloration à l'acide et à l'alcool, après coloration de Ziehl-Neelsen. Ils apparaissent regroupés en amas ou en palissade.

Les fèces représentent un prélèvement de qualité médiocre, contenant parfois de nombreux bacilles acido-alcool résistants (BAAR) qui sont mis en évidence par cette méthode et difficiles à différencier de *Map*. Les BAAR apparaissant rouges sur fond bleu.

Ces bacilles, qui ne sont généralement pas pathogènes, ont une prévalence de 3 à 76 % dans les fèces des ruminants. Cette méthode manque donc fortement de spécificité.

D'autre part, on ne peut pas mettre en évidence la totalité des bacilles paratuberculeux, notamment ceux n'ayant pas encore ou ayant perdu leur caractère acido-alcool résissant. Outre les difficultés techniques et de lecture, cette technique manque de sensibilité.

Il s'agit ainsi d'une méthode à utiliser tardivement au cours de l'évolution de la paratuberculose, car elle ne peut mettre en évidence qu'une excrétion massive, et n'est donc valable que sur les animaux dans la phase clinique.

Enfin, si le prélèvement est réalisé sur un animal présentant une forme paucibacillaire, le bacille peut ne pas être mis en évidence.

Le raclage de la paroi rectale n'est pas utile lors du prélèvement, car cette partie du tube digestif est rarement atteinte (chez les bovins, les lésions intestinales s'étendent jusqu'au rectum chez moins de 10% des animaux en phase clinique de la maladie).

Il faut néanmoins mettre au crédit de cette méthode une facilité et une rapidité d'exécution qui se traduisent par un coût relativement faible. Cependant, la lecture des lames est longue et nécessite de l'expérience.

Du fait de son caractère tardif, cette méthode est principalement utilisée comme méthode de diagnostic et non de dépistage ; on la met donc en oeuvre sur des animaux malades, atteints de diarrhée chronique (Toutefois, sa faible spécificité conduit à préconiser l'association avec une analyse sérologique).

II.3.1.1.2. Caractéristiques

Le résultat obtenu par le biais de cette technique est uniquement qualitatif et correspond à l'observation ou non d'amas de BAAR.

Les valeurs de la **spécificité** et de la **sensibilité** qui ont été estimées chez des animaux en phase clinique sont comprises respectivement entre **43 et 94%**, et **24 et 67%**. (Bourzeix, T., 1994).

La **limite de détection** de cette méthode est estimée à **10⁵ à 10⁶ bacilles par gramme de fèces.**

II.3.1.2. Histopathologie

II.3.1.2.1. Description et mise en œuvre

Cette méthode peut se réaliser après prélèvement nécropsique, ou après biopsie sur animal vivant (peu réalisé en pratique).

Les tissus à examiner (principalement l'iléon, les nœuds lymphatiques mésentériques) sont préalablement fixés dans une solution de formol à 10%, puis inclus dans de la paraffine, et découpés en sections de 4 à 5 µm d'épaisseur.

Les tissus sont alors colorés à l'hémalun-éosine ; la coloration de Ziehl-Neelsen peut également être utilisée pour mettre en évidence les germes (Bancroft, J.D. *et al.* 1996).

A l'examen microscopique, une attention particulière doit être portée à la présence de macrophages, de cellules épithélioïdes (macrophages modifiés, caractérisées par un cytoplasme très abondant qui repousse le noyau à la périphérie) contenant des BAAR, à localisation intracellulaire, et compatibles avec la présence de *Map* ; certaines cellules épithélioïdes pouvant fusionner et donner des cellules multinuclées géantes appelées cellules de Langhans.

Le diagnostic histopathologique d'une infection par *Map* nécessite l'observation de 2 ou plus BAAR compatibles avec *Map* au sein des cellules inflammatoires précédemment citées. A l'inverse, l'absence de BAAR doit être confirmée par l'observation d'au moins une coupe supplémentaire du même tissu. Une variante de cette méthode, utilisée comme méthode directe, est l'immunohistochimie à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre *Map*.

Puisque l'histopathologie met en évidence les modifications de la composition cellulaire (cellules de l'inflammation citées ci-dessus) des tissus provoquées par l'infection, cette méthode peut également être considérée comme une technique indirecte.

II.3.1.2.2. Caractéristiques

Cette technique est considérée comme très **spécifique ; la spécificité avoisine les 100% pour une personne suffisamment expérimentée.**

La sensibilité est moindre, d'environ 85 % (car elle nécessite la présence de lésions suffisamment intenses pour être identifiées ; le caractère focal des lésions peut interférer avec leur détection).

II.3.1.3. Culture

La famille des mycobactéries comporte des espèces à croissance lente, d'autres à croissance rapide. Les espèces à croissance lente correspondent à *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* (chacun étant agent de zoonose), et *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*.

Map se distingue plus particulièrement des autres mycobactéries par sa croissance extrêmement lente et son incapacité à produire de la mycobactine (sidérophore liposoluble chélateur de fer, responsable de la captation et du transport du fer à l'intérieur de la cellule).

Map est ainsi celles des mycobactéries cultivables dont la croissance est la plus lente, avec un temps de multiplication de plus de 20 heures dans des conditions de culture optimales. De ce fait, une culture primaire (et ce quelle que soit la source), nécessitera au minimum de trois à six semaines pour former une colonie à partir d'une bactérie (ou d'un amas) de *Map* (cette durée pouvant atteindre 6 mois); la température optimale de développement de *Map* est 37°C, alors qu'elle est faible à 30°C et nulle à 42°C).

Les colonies formées sont alors de petite taille (1-2 mm), habituellement blanches et bombées. Des colonies rugueuses et pigmentées sont rarement observées, et plutôt obtenues à partir de prélèvements ovins.

De plus, comme précisé ci-dessus, le développement de *Map* est dépendant de l'incorporation dans le milieu de culture d'un chélateur du fer : la mycobactine J.

- 97 à 98% des cultures positives apparaissent à partir de la douzième semaine
- 90% des cultures positives apparaissent avec plus de 6 colonies en 8 semaines
- 2 à 3% deviennent positives seulement à partir de la seizième semaine.

II.3.1.3.1. Coproculture

II.3.1.3.1.1. Description et mise en œuvre

Les échantillons fécaux (1 à 2 grammes) peuvent être utilisés frais ou après congélation.

II.3.1.3.1.1.1. Procédés de décontamination et milieux de culture

Différents procédés de décontamination sont utilisables. Ils sont obligatoires, à cause de la très longue période de culture qui est nécessaire, pour éliminer les autres bactéries dont la croissance est beaucoup plus rapide, (Collins, M.T. *et al.* 2005) :

● **décontamination 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). Milieu de culture utilisé ensuite : milieu HEY.**

Il s'agit de la méthode la plus conventionnelle, utilisée couramment en France par la majorité des Laboratoires Vétérinaires Départementaux.

● décontamination dans une solution à 4% de NaOH pendant 15 min, puis dans une solution à 5% d'acide oxalique et 0,1% de vert de malachite pendant 15 min, ainsi que dans un mélange de néomycine et d'amphotéricine B (50µg/ml) pendant une nuit. Après centrifugation, le culot de centrifugation estensemencé dans le milieu de Löwenstein-Jensen (Méthode dite de Jorgensen)

Le milieu de Herrold (HEY) est le milieu de culture usuellement utilisé en France. Il se présente comme un milieu glycérolé de gélose agar, composé de jaune d'œuf, d'une solution saline contenant au minimum 2 µg/ml de mycobactine J (ajout supplémentaire d'antibiotiques dans certains cas).

Pour chaque échantillon de fèces, cinq tubes sont généralement inoculés. Les cultures sont ensuite incubées pendant 6 mois à 37°C. Les tubes sont inspectés aux semaines 8, 12, 16 et 26 pour rechercher la croissance mycobactérienne.

Les prélèvements sont considérés comme contaminés si plus de 3 tubes présentent une contamination bactérienne ou fongique.

Les cultures positives sont le plus souvent confirmées par une coloration de Ziehl-Neelsen et/ou par PCR.

La quantification (donnée semi-quantitative) de l'excrétion fécale est également réalisée dans certains laboratoires. Elle permet communément de définir des niveaux d'excrétion (faible, moyenne, et forte excrétion fécale).

Cette information permet d'évaluer le risque de transmission par la voie fécale, et par les autres voies (lait, colostrum et placenta).

La plupart des laboratoires quantifient l'excrétion fécale mesurée par un score de 0 à 4 (en relation avec le nombre d'organismes de *Map*/gramme d'échantillon) (Collins, M.T. *et al.* 2005):

- Les laboratoires utilisant le milieu HEY convertissent le nombre moyen de colonies observées ;

0 : aucune colonie observée

1 : 1 à 9 colonies

2 : 10 à 49 colonies

3 : 50 à 99 colonies

4 : plus de 100 colonies

Les scores 3 et 4 sont obtenus chez des animaux fortement excréteurs.

II.3.1.3.1.2. Caractéristiques

Ce test est classique, et utilisé comme méthode de référence (Gold Standard) ; il est considéré comme spécifique à 100%. Les erreurs par excès sont anecdotiques et notamment liées à une infection par une mycobactérie dépendante de la mycobactine autre que *Map*.

La méthode de mise en culture standard, en particulier avec l'utilisation d'antibiotiques et de désinfectants lors de la préparation des échantillons, réduit fortement la sensibilité analytique de la méthode de coproculture : il est estimé que la phase de préparation des prélèvements diminue le nombre initial de *Map* d'un facteur supérieur à 100 (Reddacliff, L.A. *et al.* 2003b).

Par ailleurs, les souches d'origine ovine sont difficiles à cultiver sur les milieux usuels.

Rappelons également que l'excrétion du bacille paratuberculeux peut être intermittente, ce qui diminue encore la fiabilité de cette méthode au niveau individuel (**moins de 50 % des individus infectés sont ainsi détectés**).

Les valeurs de **sensibilité** vont de **40 à 60 % pour une infection subclinique, et de 60 à 95 % pour des animaux en phase clinique**.

La **limite de détection** est d'environ **50 à 100 bacilles/gramme de fèces**.

Il demeure toutefois le test le plus sensible et le plus spécifique pour détecter l'infection dans un troupeau ; ce test permet de repérer les animaux infectés de 2 (excrétion importante) à 4 ans (faibles excrétion) avant l'apparition des premiers signes cliniques (diarrhée ou amaigrissement), il convient donc de le répéter annuellement dans le cadre d'une surveillance des cheptels infectés.

Le dépistage par culture fécale individuelle, avec abattage des animaux dont le résultat est positif, est à ce jour un outil majeur pour diminuer l'excrétion de *Map* au sein d'un troupeau infecté .

Les inconvénients de cette méthode sont principalement liés à la très longue durée de la culture, le coût élevé, et le risque de contamination des cultures par d'autres bactéries ou par des moisissures (dans ce cas, une nouvelle culture devra être réalisée, ce qui augmente d'autant les délais et le coût ; de plus aucune conclusion ne pourra être donnée si la deuxième culture est également contaminée).

La culture à partir d'échantillons de sol apparaît également possible, mais avec une sensibilité deux fois moindre qu'à partir des fèces.

De plus, des échantillons environnementaux nécessitent une période de culture plus longue pour permettre une croissance significative (Whittington, R.J. *et al.* 2003).

II.3.1.3.1.3. Coproculture de mélange

Afin de réduire les coûts d'analyse lors de dépistage, certains auteurs préconisent de réaliser des mélanges de prélèvements fécaux par lot de 10, avec un protocole de culture standard par la suite.

Ainsi, lors d'une étude sur les coprocultures de mélange (10 prélèvements fécaux), 88 % (24 positifs sur 27) des échantillons fécaux mélangés contenant au minimum 1 fort excréteur (50 colonies et plus par tube) ou 1 moyen (de 10 à 49 colonies par tube) ont pu être détectés par cette technique (Wells, S.J. *et al.* 2003).

Des résultats similaires ont été obtenus lors d'une autre étude réalisée sur des troupeaux laitiers au Chili (van Schaik, G. *et al.* 2007). **En comparaison avec les cultures fécales individuelles** (procédures de décontamination et de mises en culture identiques aux procédures françaises), la sensibilité de la coproculture de mélange était de 46% (IC 95% : 29-63%) avec 5 animaux par mélange, et 48% (IC 95% : 28-68%) avec 10 animaux.

La sensibilité de la méthode apparaît logiquement plus faible pour les lots composés d'animaux faiblement excréteurs (26% et 24% respectivement pour des lots de 5 ou 10

animaux), par rapport à des lots contenant des bovins moyens ou forts excréteurs (sensibilité alors supérieure à 75%).

Le mélange de 10 échantillons fécaux apparaît donc, d'un point de vue technique et économique, comme la meilleure solution pour déterminer le statut d'un cheptel.

Cette méthode pourrait donc apparemment être utilisée pour réaliser un dépistage à moindre coût dans les cheptels.

Les Pays-Bas utilisent d'ores et déjà cette technique (mélange de 5 fèces, à hauteur de 2g par animal) dans le cadre de la certification des cheptels. Toutefois, comme le Danemark, ils utilisent des procédures de décontamination et de culture différentes des procédures françaises. Le protocole utilisé est celui de Jorgensen.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour l'application de ce procédé en France.

De la même façon, en Australie, une étude liée aux tests d'efficacité de la vaccination paratuberculeuse chez les ovins à l'aide du vaccin Gudair® a utilisé des modèles mathématiques permettant d'estimer la prévalence de la paratuberculose au sein des cheptels à partir de cultures fécales de mélange (mélanges de 50 prélèvements individuels) (Toribio, J.A. *et al.* 2007).

Les paramètres qui ont été pris en compte sont le nombre d'animaux par mélange, le nombre total d'animaux testés, ainsi que les caractéristiques de la méthode de culture utilisée.

II.3.1.3.1.4. Méthode radiométrique

Il existe également une méthode de coproculture dite méthode radiométrique, utilisant le milieu de culture BACTEC-12B, qui est un milieu de culture liquide. Cette méthode est basée sur la détection de radio-isotopes.

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).

Bien que disponible commercialement, cette méthode est assez peu utilisée.

Ses avantages sont un temps de réponse plus court (8 semaines en moyenne, avec un maximum de 12 semaines contre 16 pour la culture standard), une sensibilité accrue, et la capacité à détecter les souches ovines en culture.

Elle nécessite toutefois un équipement cher ainsi qu'une logistique permettant la gestion des déchets radioactifs.

Les quelques laboratoires (en France) utilisant le milieu BACTEC déterminent une quantification (semi-quantitatif) de l'excrétion en évaluant le temps (en semaines) écoulé pour obtenir une culture positive :

- 0 : aucune colonie observée après 12 semaines d'incubation
- 1 : après plus de 8 semaines d'incubation
- 2 : entre 6,1 et 8 semaines d'incubation
- 3 : entre 4,1 et 6 semaines d'incubation
- 4 : moins de 4 semaines d'incubation

Cette quantification repose sur l'existence d'une corrélation entre le temps écoulé avant détection et le nombre de *Map* inoculés dans le milieu BACTEC.

L'utilisation de la méthode radiométrique sur mélange de prélèvements fécaux a été envisagée dans l'espèce caprine, pour réduire les coûts et les manipulations lors de dépistage (Eamens, G.J. *et al.* 2007).

La dilution d'un seul prélèvement positif par mélange a été étudiée pour des rapports allant de 1 pour 5 jusqu'à 1 pour 50 ; les cultures fécales étaient validées par PCR *IS 900* couplée à une méthode RFLP (cf. infra).

Pour la dilution de 1 pour 25, la détection est possible dès la dixième semaine pour 13 des 16 mélanges réalisés (les animaux utilisés excrétaient plus de 2×10^4 *Map* / g de fèces).

Les 2 caprins qui n'étaient détectés que par la culture individuelle excrétaient faiblement (moins de 2×10^3 *Map*/g de fèces), un autre caprin n'étant détecté qu'à la dilution de 1 pour 10.

Il est à noter que 13 des 16 caprins excréteurs étaient classés comme de faibles à moyens excréteurs ($\leq 2 \times 10^5$ *Map*/gramme de fèces).

Cet outil (culture fécale par méthode radiométrique sur lot de 25 caprins) semble donc utilisable lors de dépistage des cheptels caprins vis-à-vis de la paratuberculose, et permettrait, selon les auteurs, un coût diminué de 40 % par rapport à l'utilisation de sérologies individuelles, et de 75 à 90% par rapport à l'utilisation de cultures fécales individuelles.

Il s'agit à ce jour de la seule méthode sur mélange réalisable et validée chez l'espèce caprine.

II.3.1.3.2. Culture à partir d'échantillons tissulaires

Peu de données relatives aux qualités de cette méthode sont disponibles.

Dans l'étude de Huda et Jensen, la **sensibilité mesurée chez des bovins en phase clinique est de 100%** (Huda, A. *et al.* 2003). Néanmoins, l'étude n'incluant que 16 bovins, dont six seulement atteints de paratuberculose, les résultats doivent être considérés avec précaution.

Cette méthode apparaîtrait néanmoins plus sensible qu'une coproculture standard, et plus sensible également que l'histopathologie.

Chez les ovins, cette méthode apparaît également comme la plus sensible pour détecter précocement l'infection après une exposition naturelle à *Map*, de 6 à 12 mois après exposition. La comparaison ayant été effectuée par rapport au test cutané intradermique, au test à l'interféron gamma, à la coproculture et à l'histopathologie (Reddacliff, L.A. *et al.* 2004).

La spécificité apparaît identique à celle de la coproculture (100%).

II.3.1.4. Détection par PCR

II.3.1.4.1. Intérêt du séquençage de *Map* dans la méthode PCR.

Pendant de nombreuses années, l'élément d'insertion **IS900** (présent chez *Map* à hauteur de 14 à 20 copies) était considéré comme hautement spécifique de *Map*.

Cette séquence est encore utilisée pour le choix des amorces utilisées dans la méthode PCR, mais également dans des méthodes de typage moléculaire tels que la RFLP.

A présent, l'existence de séquences **IS900-like** chez d'autres mycobactéries (Cousins, D.V. *et al.* 1999 ; Englund, S. *et al.* 2002) engendre de forts doutes quant à la spécificité de ces méthodes.

A l'heure actuelle, des séquences plus spécifiques de *Map* sont recherchées, et plusieurs séquences alternatives ont déjà été proposées :

- **IS*mav*2** (Stommenger, B. *et al.* 2001)
- **HspX** (Ellingson., J.L. *et al.* 1998)
- **F57** (Poupart, P. *et al.* 1993)

Le génome de *Map* (**Figure 7** : souche isolée à partir d'un cas clinique bovin), a été publié en 2005, et consiste en une séquence circulaire unique de 4 829 781 paires de bases, avec une composition G + C de 69,3% (Li, L. *et al.* 2005).

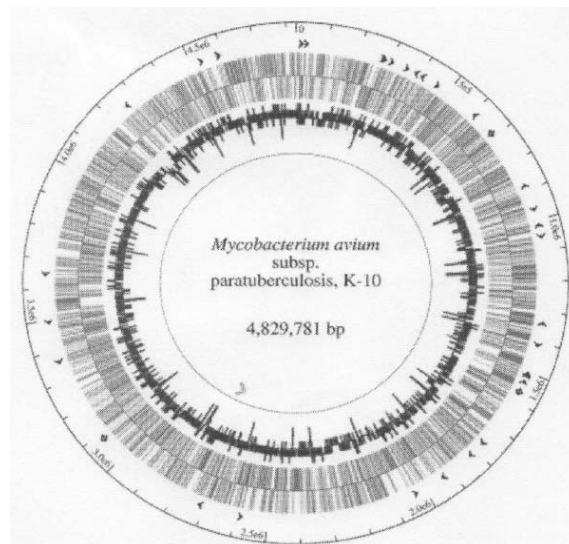


Figure 7 : Représentation circulaire de la souche K-10 de *Map*

Le séquençage récent du génome de *Map* a permis de mettre en évidence 2 séquences spécifiques, sans séquence homologue observée chez les autres mycobactéries : il s'agit de **IS-MAP02** (six copies) (une seule séquence homologue détectée chez *Legionella pneumophila*, avec seulement 28% d'identité) et **IS-MAP04** (cinq copies) (séquences similaires retrouvées chez *Arthrobacter nicotinovorans* et *Streptomyces coelicolor* (Li, L. *et al.* 2005).

Une technique de PCR nichée ciblant *IS-MAP02* a été développée, bien que l'utilité de cette méthode à des fins diagnostiques nécessite encore des améliorations.

In fine, le séquençage a permis de mettre en évidence 161 séquences spécifiques du génome de *Map*, la région la plus longue mesurant 15,9kb.

II.3.1.4.2. PCR couplée à une électrophorèse sur gel d'agarose (*IS900*, *ISmav2*)

II.3.1.4.2.1. Description et mise en œuvre

Les séquences d'insertion (IS) sont des éléments génétiques mobiles et de petite taille.

L'identification de la séquence *IS900* date de la fin des années 1980, et la méthode PCR l'utilisant fut considérée comme l'un des premiers tests vraiment spécifiques de *Map*. Toutefois, comme indiqué ci-dessus, des études récentes remettent en cause la spécificité de cette méthode, par la présence de séquences homologues chez d'autres espèces de mycobactéries.

Certains auteurs affirment néanmoins que les amplicons des séquences *IS900*-like pourraient aisément être différenciés des amplicons *IS900* de *Map* par la méthode RFLP, qui utilise une étape de digestion par des enzymes de restriction.

Deux couples d'amorces spécifiques de la séquence *IS900* sont fréquemment utilisées : les amorces de Millar et celles de Vary.

Sur la Figure 8, (Harris, N.B. *et al.* 2001) représentant l'extrémité 5' de *IS900*, les séquences des amorces déterminées par Millar *et al.* d'une part, Vary *et al.* d'autre part sont localisées.

Les amorces de Millar (Millar F et Millar R) sont représentées par des flèches pleines, celles de Vary (Vary F et Vary R) par des flèches en pointillés.

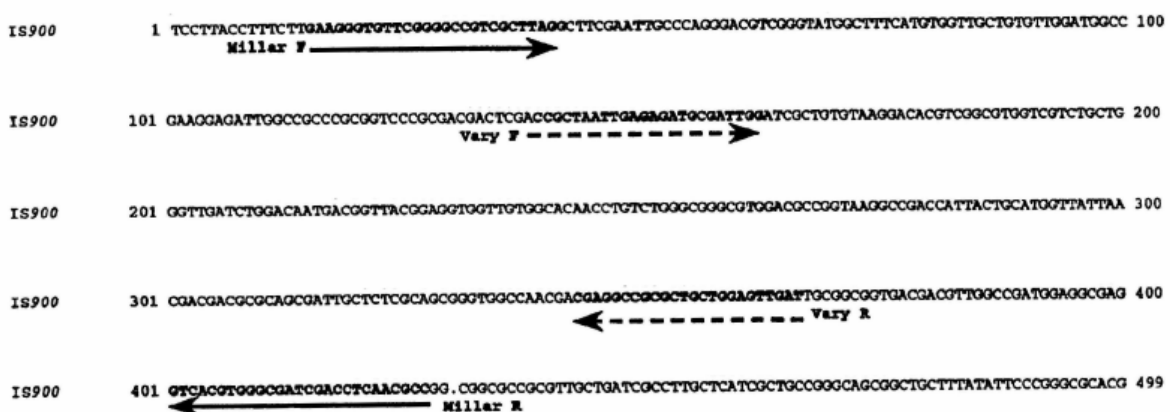


Figure 8 : représentation des amorces de Millar et Vary sur l'extrémité 5' de *IS900*.

Le produit de la PCR est visualisé grâce au bromure d'éthidium et par exposition aux UV, après électrophorèse en gel d'agarose.

II.3.1.4.2.2. Caractéristiques

La **limite de détection** annoncée est de **5 x 10³ UFC/gramme de fèces** ; néanmoins, cet objectif est très rarement atteint, et ce pour plusieurs raisons :

- quantité excessive d'ADN non spécifique appartenant à l'hôte ou à d'autres bactéries que *Map*
- substances inhibant l'amplification (par interférence avec l'activité de la Taq polymérase) dans les échantillons cliniques telles que les sels biliaries, la bilirubine, l'urobilinogène, des polysaccharides...)
- qualité de préparation (dont extraction) de l'ADN.

Par exemple le lait, du fait de sa richesse en lipides et en calcium, est un milieu complexe, difficile à analyser par la méthode PCR.

La **sensibilité** de cette méthode est similaire à celle de la coproculture.

Concernant la préparation des échantillons, un traitement par ultrasonication répétée des prélèvements permettrait de déstructurer les amas de *Map*, augmentant la sensibilité de la technique.

Outre sa rapidité de réponse, son avantage réside également dans sa capacité à mettre en évidence les souches réfractaires à la culture (notamment les souches ovines).

II.3.1.4.3. PCR en temps réel (système TaqMan®)

II.3.1.4.3.1. Description et mise en œuvre

La PCR en temps réel, utilisable sur tous les types d'échantillons (eau, lait, tissu, fèces), est une alternative à la PCR classique dont la révélation se fait après électrophorèse.

Elle repose sur le plus souvent sur l'amplification de la séquence *IS900* et permet de s'affranchir de la similitude de séquences retrouvées chez certaines mycobactéries (*IS900-like*). Cette méthode repose, en plus de la paire d'amorces spécifiques *d'IS900*, sur une amorce interne qui garantit une plus grande spécificité (Rodriguez-Lazaro, D. *et al.* 2005).

La technique est connue sous le nom de système TaqMan® (Applied Biosystems – Roche Molecular Systems, Branchburg, Allemagne).

L'autre intérêt majeur de cette méthode de détection par amplification de fragments ADN est la mise en évidence des faux négatifs, qui sont toujours possibles lors de présence d'inhibiteurs de la PCR ; ceci est particulièrement intéressant lors de recherche de *Map* dans certains types d'échantillons tels que le lait.

II.3.1.4.3.2. Caractéristiques

- Dans l'étude de Rodriguez-Lazaro *et al.*, utilisant le gène *IS900*, la **spécificité affichée est de 100%** : ces résultats reposent sur l'analyse de 18 isolats de *Map*, 17 souches de mycobactéries autres que *Map*, et 25 souches bactériennes non-mycobactériennes.

La **limite de détection est inférieure à 3 copies de génome avec 99% de probabilité**, ou bien encore à 12 cellules de *Map* avec 99% de probabilité. De plus, une copie d'ADN unique peut être détectée dans 67% des cas.

- L'utilisation d'une **PCR en temps réel utilisant la séquence F57** a également été décrite, pour la détection de *Map* à partir de lait de tank, d'échantillons tissulaires ou fécaux. La **limite de détection** observée est de **100 cellules de *Map* par ml de lait, ou bien de 100 cellules de *Map* contenues dans 200 mg de fèces** (Bosshard, C.T. *et al.* 2006).

- Un kit utilisant le système TaqMan®, appliqué au gène *ISmav2*, sur matière fécale est également proposé (Wells, S.J. *et al.* 2006).

La spécificité obtenue est de 99,7% ; elle apparaît donc supérieure à celle des méthodes ELISA comparées (Herdcheck® ELISA (Se : 26% / Sp : 94,9%) et ParaCheck® (Se : 27% / Sp : 98%) ; la sensibilité est comparable aux méthodes ELISA (29% ; IC 95% : 24-35%).

Sa sensibilité relative est de 4% pour les faibles et moyens excréteurs (12-13% pour les techniques ELISA), et de 76% pour les forts excréteurs (67% pour les ELISA sur le lait).

Cette méthode pourrait donc être utilisée comme un test rapide pour la détection des forts excréteurs fécaux, qui sont les plus susceptibles de transmettre l'infection aux autres animaux.

Le prix de cette méthode est environ 80% celui d'une culture fécale traditionnelle utilisant le milieu HEY, mais trois fois plus cher qu'un ELISA.

II.3.1.4.4. PCR multiplexe

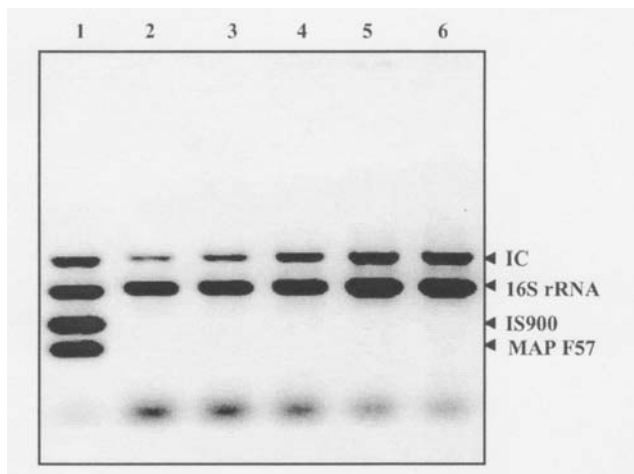
Cette méthode, comme la PCR en temps réel, est présentée comme une solution aux cas faussement positifs existant avec la PCR conventionnelle *IS900* ; l'enjeu étant encore d'améliorer la spécificité de cette technique.

Cette méthode PCR repose sur la co-amplification du gène d'espèce mycobactérienne 16S rRNA, et des séquences génétiques *IS900* et *f57*.

La méthode incorpore en plus un contrôle interne de l'amplification.

Cette technique a été appliquée avec succès sur 10 isolats de *Map*, et 59 isolats d'autres bactéries, dont 24 mycobactéries (Tasara, T. *et al.* 2005).

Figure 9 : résultat de PCR multiplexe après migration par électrophorèse



La colonne 1 correspond à une souche de *Map*, les lignes 2, 3, 4, 5, et 6 à différentes mycobactéries testées, en plus de *Map*.

Utilisée sur du lait artificiellement contaminé, la **limite de détection** a été de **10 cellules de *Map*/ml**.

II.3.2. Techniques indirectes

Par comparaison avec les méthodes de détection dites directes, les méthodes indirectes permettent de mettre en évidence la réaction du système immunitaire de l'hôte infecté : il s'agit donc, soit de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, soit de la réponse immunitaire à médiation humorale. Ce sont donc principalement des tests immunologiques.

Afin d'interpréter au mieux les résultats de ces tests, il est important de connaître l'évolution des deux composantes de la réponse immunitaire lors des différentes phases d'évolution de la maladie chez un animal sensible.

II.3.2.1. Evolution de la réponse immunitaire chez un animal infecté

Suite à l'infection par *Map*, la coexistence de réponses immunitaires cellulaire et humorale est possible (Figure 10) pendant quelques temps.

Toutefois, au départ, la réponse immunitaire induit principalement le recrutement et la prolifération des LT CD4⁺, des LT CD8⁺ cytotoxiques, et d'autres cellules immunitaires mononuclées sécrétant de fortes quantités de cytokines, dont l'IFN-gamma. La réponse à ce moment est de type Th1

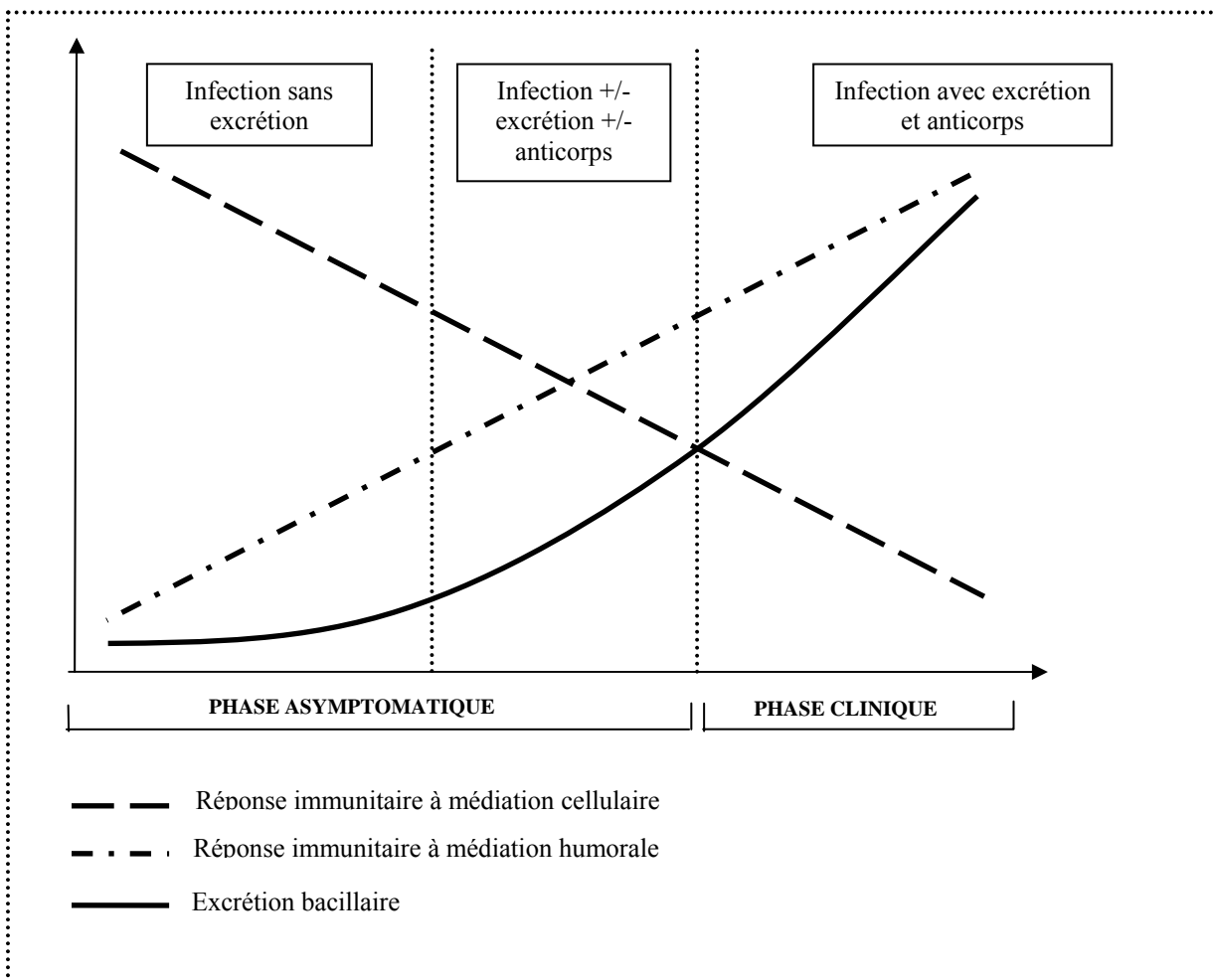
Puis au cours de l'évolution de la maladie, la réponse immunitaire se polarise progressivement vers le type Th2, et ce type de réponse est largement prédominant en fin d'évolution. Il promeut notamment la prolifération des LB. Le bacille ayant une localisation intra-cellulaire, il est à noter que la réponse de type Th2 n'a, dans ce cas, aucun rôle protecteur.

Il apparaît ainsi que la réponse immunitaire à médiation cellulaire est prépondérante pendant la phase sub-clinique, la réponse à médiation humorale ne devient détectable que tardivement par rapport à l'évolution clinique de la maladie (Chiodini, R.J., 1996).

Le taux d'anticorps anti-*Map* augmente alors fortement et la réponse à médiation cellulaire s'effondre (anergie) ; tous les signaux de recrutement local et d'activation des macrophages disparaissent, laissant la possibilité au germe de se multiplier et la charge bactérienne devient plus élevée.

L'épuisement du système immunitaire en phase terminale se traduira finalement par une chute des anticorps (anergie sérologique), ceux fixant le complément disparaissant plus vite que ceux détectés par la méthode ELISA.

Figure 10 : évolution des deux composantes de la réponse immunitaire et de l'excrétion.



II.3.2.2. Influence de la période péri-partum sur les tests immunologiques

Une phase d'immunosuppression est décrite en peri-partum chez les ruminants ; il semble nécessaire d'évaluer son impact potentiel sur la qualité des résultats fournis par les tests immunologiques employés dans le cadre du dépistage de la paratuberculose.

Le péri-partum a effectivement un effet significatif sur la fonction immunitaire, avec une baisse significative des Ac spécifiques de *Map* (tant dans le sérum que dans le lait). L'immunosuppression correspondante concerne également de façon significative la réponse à médiation cellulaire (Stabel, J.R. *et al.* 2004).

La parturition a ainsi un effet significatif sur les tests du diagnostic immunologique de la paratuberculose.

II.3.2.3. Mesure de la réponse immunitaire à médiation cellulaire

L'intérêt majeur de tests permettant de mesurer la réponse immunitaire à médiation cellulaire, est théoriquement de détecter les animaux infectés avant même qu'ils excrètent *Map* dans les fèces (phase sub-clinique) (se reporter à la figure 10 : évolution des deux composantes de la réponse immunitaire et de l'excrétion).

Lorsque la réponse cellulaire est active, la réponse immunitaire a pour conséquence l'accumulation de macrophages, de cellules épithélioïdes et cellules de Langhans, typiquement situées dans la muqueuse intestinale et les nœuds lymphatiques régionaux.

Si de tels tests se révélaient efficaces, il deviendrait possible de mettre en place des dépistages utilisables chez les jeunes animaux, permettant d'évaluer à court terme les effets des mesures de prévention à l'échelle d'un cheptel.

II.3.2.3.1. Test cutané intradermique et test à l'interféron-gamma

II.3.2.3.1.1. Description et mise en œuvre

Le test cutané intradermique (TCI) est déjà couramment utilisé pour détecter les infections à mycobactéries (test d'IntraDermoTuberculation ou IDT utilisé dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine) ; il mesure la réaction d'hypersensibilité retardée de type IV développée par l'organisme infecté, après contact avec un antigène mycobactérien ; utilisé premièrement dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine, il est à présent également disponible commercialement (excepté en France) pour la détection de la paratuberculose.

Toutefois, bien que présente, la réaction d'hypersensibilité est moindre dans le cas de la paratuberculose par rapport à celui de la tuberculose.

L'inflammation créée au point d'injection du *dérivé protéique modifié de Johnin* (0,1 ml de solution à 1,5 mg/ml de Johnine-PPD), qui est un extrait antigénique mycobactérien, est évaluée par le calcul de l'augmentation du pli de peau 72 heures après injection.

Malheureusement, ce produit n'est pas disponible en France. Le test est donc réalisé en utilisant la technique dite d'intradermotuberculination comparative (IDTc). Elle repose sur la comparaison de l'intensité des réactions obtenues avec la tuberculine aviaire et la tuberculine bovine, administrées simultanément par voie intradermique en 2 points distincts, à raison de 0,1ml.par point.

Le test à l'interféron-gamma est l'équivalent *in vitro* du TCI.

Le test à l'interféron-gamma détermine l'amplitude de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, en quantifiant l'interféron-gamma produit par les lymphocytes contenus dans un échantillon de sang (prélevé sur héparinate de lithium) et activés avec des antigènes de *Map*.

Ainsi, le sang total est ainsi mis en contact avec une PPD de *Map* pendant 24 heures, puis la production d'IFN-gamma est mesurée par ELISA.

Deux tests interférons sont actuellement disponibles sur le marché : l'un distribué par IDEXX (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME), l'autre se nommant BOVIGAM™ (CSL, Parkville, Australie).

II.3.2.3.1.2. Caractéristiques

II.3.2.3.1.2.1. IDTc

En France, la **spécificité obtenue avec l'IDTc est médiocre** : une réaction importante vis-à-vis de la tuberculine aviaire confirme seulement un contact avec une mycobactérie appartenant au groupe avium dans lequel figure l'agent de la paratuberculose.

Donc à ce jour, du fait de sa faible spécificité et du caractère aléatoire au fur et à mesure que la progression vers la phase clinique, l'IDTc ne doit pas être considérée comme un test diagnostic fiable de la paratuberculose

II.3.2.3.1.2.2. TCI et test IFN

Selon les données bibliographiques, la **sensibilité** du TCI apparaît tout de même faible pour le dépistage de la paratuberculose ; la sensibilité du test interféron oscillant entre 21 et 65% selon les auteurs.

La **spécificité** du test IFN varie également fortement en fonction de la souche bactérienne utilisée pour purifier l'antigène (Jungersen, G. *et al.* 2002), des algorithmes décisionnels choisis (Kalis, C.H.J. *et al.* 2003) : elle est comprise entre **26 et 97,6%** selon les auteurs.

Par exemple, la spécificité du test à l'IFN γ a été comparée à celle du TCI par Kalis *et al.*

Dans cette étude, la spécificité des tests est de :

- 93,5% pour le TCI, en prenant comme valeur limite une augmentation du pli de peau de 4 mm (88,8% si 2mm, 91,3% si 3 mm)
- 93,6 % pour le test à l'IFN-gamma (utilisation d'un algorithme développé par l'auteur).

Lors de l'utilisation des algorithmes proposés par les distributeurs du test IFN, le test montre une spécificité de 66,1% (algorithme fourni par CSL) et 67% (algorithme utilisé par IDEXX) respectivement.

De plus, sans raison clairement identifiée, la spécificité varie fortement pour les deux tests en fonction des élevages (entre 58 et 100% pour le TCI ; entre 71 et 99% pour le test INF) (Kalis, C.H.J. *et al.* 2003) .

Lors de l'utilisation en parallèle des deux tests, et dans le cas où un animal n'est déclaré infecté par *Map* que si les deux tests donnent un résultat positif, la spécificité alors obtenue est de 97,6%.

Toutefois, ce résultat doit être considéré avec prudence, étant donné que la concordance entre les 2 tests s'avère médiocre ($\kappa=0,41$) (Kalis, C.H.J. *et al.* 2003).

L'intérêt principal du test cutané est une facilité de mise en oeuvre, et un coût relativement faible. Mais il reste peu fiable. L'intérêt du test IFN est de ne demander qu'une seule manipulation des animaux (contre deux pour le test cutané), et une lecture plus objective des résultats.

Toutefois, de nombreux désavantages peuvent être évoqués pour les deux méthodes :

- Ces deux méthodes sont fortement pénalisées par l'absence d'un antigène réellement spécifique de *Map*, ce qui oblige à multiplier les tests, alors que la spécificité de ces tests devrait être aussi élevée que possible.
- Certains animaux non infectés pourraient avoir une réaction faiblement positive (faux-positifs) pendant quelques semaines suite à l'exposition avec d'autres mycobactéries environnementales, en raison d'une réaction croisée. Ceci est également observé dans le cas de dépistage de la tuberculose bovine.
- Lors de campagne de vaccination contre la paratuberculose (interdite en France à ce jour), des interférences existent, parfois pendant plusieurs années, malgré l'arrêt de la vaccination.

La spécificité du test IFN apparaît donc inférieure à celle de la sérologie en ELISA, la sensibilité des tests étant variable en fonction des études.

De plus il faut noter que l'obligation d'utiliser les échantillons de sang dans un bref délai après le prélèvement pour le test IFN apporte d'autres inconvénients spécifiques à cette méthode, notamment pour les dépistages de masse.

En effet, pour qu'elle soit optimale et précise, cette technique doit être réalisée dans des conditions strictes de délai (entre 12 et 24 heures après le prélèvement) et de respect de la température de conservation (entre 15,6 et 21,1°C) (Stabel, J.R. *et al.* 2001).

Ainsi, plus une interprétation plus précise du test IFN, l'utilisation d'un mitogène ou d'un super antigène comme contrôle positif serait utile, notamment pour 2 raisons :

- identification des animaux mauvais répondeurs ou anergiques qui ne sont pas capables de produire une réaction immunitaire (stade terminal de paratuberculose, infection par un agent immunosuppresseur)
- vérification que les lymphocytes du sang complet sont encore fonctionnels au moment du test (contrôle des effets du transport et du stockage).

Mais à ce jour, peu des travaux publiés ont validé l'utilisation d'un contrôle positif dans le cadre du dépistage de la paratuberculose des ruminants.

Parmi les activateurs déjà testés (Pokeweed mitogen, SEA, concanavaline A, phytohémagglutinine (PHA)), la PHA reproduit le plus conformément les modifications de réaction à l'antigène au cours de l'évolution (déjà utilisé comme contrôle positif dans le cadre de la tuberculose humaine) ; néanmoins il faudrait le valider pour d'autres espèces que les bovins.

II.3.2.3.2. Autres tests représentatifs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire

Les tests d'inhibition de la migration des macrophages, ou encore de transformation lymphoblastique, ont notamment permis la mise en évidence de la réaction immunologique à médiation cellulaire.

Ils sont néanmoins coûteux et nécessitent un laboratoire très spécialisé car ils requièrent une technicité importante.

Nous ne les développerons pas ici.

II.3.2.4. Mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale

La présence d'anticorps dirigés contre *Map* est interprétée comme l'incapacité de la réponse immunitaire cellulaire à juguler l'infection et, par voie de conséquence, constitue la preuve de l'extension de l'infection. **L'animal séropositif représente donc un danger épidémiologique en tant que candidat au statut d'animal excréteur, voire de candidat à l'expression clinique de la paratuberculose.**

Ces méthodes permettant de mettre en évidence la réponse humorale de l'hôte, et étant donné que l'intensité de ce type de réponse augmente (Figure 10) au cours de l'évolution clinique, l'âge des bovins au moment du test peut influencer les résultats obtenus (maladie d'évolution chronique).

II.3.2.4.1. Sérologie : méthode ELISA indirecte

II.3.2.4.1.1. Description et mise en œuvre

La méthode ELISA est une technique immuno-enzymatique. Les Ac n'étant détectés au plus tôt que 10 à 17 mois après l'infection, il n'est pas conseillé de réaliser cette analyse sur des animaux ayant moins de 15 à 18 mois (utilisée à partir de 24 mois en pratique).

En fonction du test ELISA utilisé, divers antigènes de *Map* sont fixés sur les parois du puits d'une microplaque en polystyrène.

Après utilisation ou pas d'une étape de préabsorption (*cf. infra*), les échantillons de sérum à tester sont déposés dans les puits de la microplaque. S'il existe des anticorps spécifiques de *Map* dans le sérum, des complexes *Map-anticorps* se forment et les anticorps spécifiques sont alors retenus sur les parois du puit.

Après lavage, un anticorps dirigé contre les immunoglobulines de ruminant couplée à une enzyme est ajouté. Ce conjugué se fixe sur le complexe immun précédemment formé.

A la suite d'un second lavage, le substrat est mis en présence de l'enzyme qui assure sa transformation en un composé coloré.

L'intensité de la coloration mesure le taux d'anticorps dans le sérum à tester.

Possédant une sensibilité et une spécificité supérieures aux deux autres techniques sérologiques disponibles (test de Fixation du Complément et test d'Immunodiffusion en gélose), la sérologie ELISA les a peu à peu supplantées.

L'un des principaux inconvénients de cette méthode est lié à l'apparition tardive de la réponse anticorps ; elle ne permet donc pas le dépistage précoce des animaux infectés.

En contrepartie, cette technique a comme avantage d'être disponible dans de nombreux laboratoires d'analyse, de permettre l'obtention de résultats dans des délais faibles, et un coût d'analyse modéré.

En conséquence de l'absence de données sur les caractéristiques des tests chez les ovins (et les caprins), les données obtenues dans l'espèce bovine sont généralement extrapolées aux deux autres espèces, en attendant une évaluation ultérieure.

Devant la multiplicité des tests sérologiques ELISA disponibles sur le marché, en fonction des pays, certains auteurs ont cherché à comparer les caractéristiques et les qualités de chacun d'entre eux.

II.3.2.4.1.2. Comparaison des différents tests ELISA : caractéristiques analytiques

Les données des fournisseurs sont fournies dans le Tableau 4 ci-dessous (Köhler, H. *et al.* 2003). Il s'agit d'ELISA indirects.

Tableau 4 : caractéristiques et qualités des principaux tests ELISA disponibles

ELISA	Svanova	IDEXX	Pourquier	Pfizer Santé Animale	Synbiotic Corp.,
Nom déposé	SVANOVIR® ELISA	Herdcheck® <i>M. paratuberculosis</i> ELISA	ELISA Paratuberculosis	Paracheck ELISA®	SERELISA ParaTB®
Antigène	Polysaccharide lipoarabinomannan (LAM)	Cellule entière	Antigène protoplasmatique	Antigène protoplasmatique	
Absorption du sérum	Non ³	Oui	Oui	Oui	Non
Antigène pour l'absorption du sérum ²	Non	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>	
Valeur cutt-off	32-53% (OD%)	0,15–0,3 (S / P-value)	60-70% (OD%)		
Spécificité ¹ (%)	~ 76	~ 94 / [0,985-0,995]	~ 99	98	
Sensibilité ¹ (%)	~ 70	~ 55 / [30-40]	~ 53	27	

¹ : données fournisseur

² : la préabsorption du sérum avec une suspension contenant des antigènes de *Mycobacterium phlei* est connue pour augmenter la spécificité du test ELISA. Cette étape permet de piéger les anticorps non spécifiques dirigés contre les mycobactéries environnementales, corynébactéries et *Nocardia*, pouvant potentiellement réagir avec les antigènes de *Map* (réactions croisées) ; la sensibilité reste inchangée.

³ : LAM étant considéré comme un antigène hautement spécifique de *Map*, une étape de préabsorption n'est pas requise.

- La **sensibilité** de la sérologie par ELISA (Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L. *et al.* 1995) (test utilisé : **Map Antibody Test Kit ; Herdcheck MptAb, Idexx Skandinavia AB, Sweden**) est établie par comparaison avec la culture fécale, considérée à ce jour comme la méthode de référence. La sensibilité est estimée à **87 %** pour des bovins en phase clinique, mais seulement de **15 %** pour des animaux au stade sub-clinique.

La méthode ELISA présente une forte **spécificité**, qui dépend bien évidemment du seuil de positivité choisi (voir exemple du test IDEXX, tableau 4)

- Collins *et al.* (Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R *et al.* 2005) ; étude réalisée en sérologies individuelles sur 359 bovins laitiers de troupeaux indemnes, et 2094 bovins laitiers de cheptels déclarés infectés ; la positivité est déterminée par coproculture.

Sur le sang :

- ELISA A : HerdCheck® M. paratuberculosis ELISA, IDEXX laboratories, Inc., Westbrook, Maine ; ELISA “absorbé”
- ELISA B : ParaCheck® ; Prionics, Omaha, Nebraska ; ELISA “absorbé”
- ELISA D : SERELISA ParaTB® ; Synbiotic Corp., San Diego, CA, USA

- ELISA C : ELISA Paratuberculosis ; Institut Pourquier, Montpellier, France.

Le kit C étant reconnu et utilisé en France.

Sur le lait :

Spécificité comparée des cinq tests ELISA

- ELISA E : non commercialisé au moment de l'étude, développé par Antel BioSystems, Inc., Lansing, MI

Tableau 5 : spécificité des 5 tests ELISA comparés.

Test ELISA	Spécificité moyenne	Dispersion de spécificité inter-élevage
A	95,26 (342/359)	[84 – 100]
B	99,72 (358/359)	[98,5 – 100]
C	100 (359/359)	[100]
D	84,91 (349/359)	[62,0 – 94,9]
E	99,72 (351/352)	[98,5 – 100]

La spécificité des tests B, C et E est supérieure ou égale à 99,8% (et non statistiquement différente) ; elle est inférieure pour les deux autres.

La spécificité des tests A et D varie respectivement entre 84 et 100% pour A, et entre 62 et 94,6% pour D. Les variations inter-élevages enregistrées pourraient notamment être expliquées par la diversité des flores microbiennes, y compris mycobactériennes, qui étaient présentes.

Tableau 6 : sensibilité des 5 tests ELISA comparés pour leur capacité à détecter les animaux excréteurs (test de référence : coproculture)

Score d'excrétion fécale	Test A	Test B	Test C	Test D	Test E
0	6,31 (92/1459)	2,88 (42/1457)	1,44 (21/1454)	22,28 (323/1450)	3,69 (50/1355)
0,1 – 1,0	9,61 (29/229)	9,61 (22/229)	6,99 (16/229)	28,57 (50/175)	11,68 (23/197)
1,1 – 2,0	17,65 (12/68)	23,53 (16/68)	19,12 (13/68)	50,00 (25/50)	26,15 (17/65)
2,1 – 3,0	63,89 (23/36)	55,56 (20/36)	55,56 (20/36)	56,00 (14/25)	43,33 (13/30)
3,1 – 4,0	76,83 (63/82)	73,17 (60/82)	81,71 (67/82)	88,24 (45,51)	72,22 (52/72)
Tous excréteurs cumulés	28,92 (120/415)	28,43 (118/415)	27,95 (116/415)	44,52 (134/301)	28,85 (105/364)

La sensibilité des tests à détecter les animaux excréteurs n'est pas statistiquement différente pour quatre des tests (27,95 à 28,95%). La sensibilité du test D est plus élevée (44,5%, $p < 0,05$).

Quelle que soit le test employé, il apparaît clairement que la sensibilité des techniques ELISA augmente d'autant plus que l'animal excrète *Map* en grandes quantités (sensibilité moyenne de 78,4% pour les forts excréteurs).

La présence d'animaux séropositifs non détectés comme excréteurs, peut être due :

- Au fait que l'animal est effectivement infecté, mais excrétrait en dessous des limites de détection de la culture, ou n'excrétait pas le jour du prélèvement.
- A une simple exposition à *Map sans infection*, entraînant la mise en place d'une immunité, qui n'est pas reliée à l'apparition d'une infection ; par exemple chez un adulte, dont on sait qu'ils sont plus résistants à l'infection (il s'agirait alors d'un « faux-positif »)

Les auteurs ont également mis en évidence qu'un animal (un bovin en l'occurrence) peut répondre à une infection par *Map* par la production d'anticorps qui sont détectés par un des tests ELISA, mais pas par les autres. Ceci peut être expliqué par le fait que les différents tests utilisent des antigènes différents.

Ainsi, l'identification de la diversité des antigènes et des épitopes de *Map* qui induisent une réponse humorale chez les bovins permettrait d'améliorer significativement la qualité des tests de diagnostic.

Un test ne reposant que sur un seul antigène souffrira probablement d'un manque de sensibilité diagnostique. De ce fait, en augmentant au maximum la spécificité, cela confirme le fait qu'il est utile de multiplier les tests pour améliorer la sensibilité et la spécificité.

Toutefois, pour les tests ELISA A, B, C, E, les bovins dont les résultats sont «fortement positifs» ont une probabilité d'être excréteurs de plus de 90 %, si la prévalence sérologique au sein du troupeau est de plus de 10%. De même, pour un test donné, des valeurs prédictives positives peuvent être calculées en fonction du niveau de positivité de l'ELISA, ainsi que la prévalence sérologique au sein du troupeau.

Dans un souci d'économie, pour les cheptels les plus sévèrement atteints, un test de confirmation par culture fécale ne serait ni efficace, ni financièrement intéressant.

Une réserve doit être émise cependant : d'un point de vue individuel (*utilisation non recommandée par le fabricant*), si le résultat obtenu avec un test ELISA est positif, l'utilisation d'un autre test ELISA chez un animal en phase sub-clinique a de fortes chances de donner un résultat différent à cause de la faible valeur prédictive positive des tests (McKenna, S.L.B. *et al.* 2006 ; étude réalisée sur 994 bovins abattus en 99, sur trois tests approuvés par le Département de l'Agriculture américain. La technique de référence était ici l'isolement à partir des tissus.

La culture fécale, pour le dépistage individuel, reste donc la méthode la plus appropriée dans ce but, malgré les nombreux inconvénients que nous avons cités plus haut.

Dans le contexte français, si la confirmation par culture fécale des animaux qui sont positifs en ELISA est maintenue comme procédure de confirmation, une certaine proportion des cheptels qualifiés comme indemne le seront faussement (existence des faux-négatifs en coproculture).

Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas en pratique de méthode alternative, notamment pour remplacer la culture fécale comme méthode de confirmation.

Certains auteurs considèrent (notamment Collins, M.T. *et al.* 2005) qu'étant donné que les tests sérologiques ELISA détectent moins d'un tiers des animaux infectés par *Map* et qu'ils sont possiblement excréteurs dans un troupeau, le pourcentage d'animaux testés positifs pourrait être au minimum multiplié par trois pour donner une estimation de la prévalence réelle de l'infection au sein d'un troupeau.

La valeur prédictive positive de ce test est acceptable dans les cheptels où la prévalence de *Map* est modérée à forte, mais elle demeure très faible dans les cheptels dont le nombre d'animaux infectés est très faible.

De même, à cause cette fois de la faible sensibilité, la valeur prédictive négative est faible dans les troupeaux où la prévalence est moyenne ou forte, alors qu'elle est acceptable dans les cheptels à faible prévalence.

II.3.2.4.1.3. Sérologies sur lait (individuel ou de mélange)

Peu à peu, afin de pouvoir utiliser à moindre coût cette méthode lors de dépistage à grande échelle, les différents laboratoires cherchent à développer des sérologies ELISA sur

des lots d'animaux (malgré le problème de la trop faible sensibilité à ce jour), mais également sur le lait (dépistage facilité dans les troupeaux laitiers).

La sérologie sur lait, développée par Antel BioSystem, permettrait en plus d'obtenir un résultat semi-quantitatif, fort utile pour la sélection des animaux à réformer. A ce jour, de nombreux tests ELISA sont en développement, les comparaisons n'étant pas encore disponibles.

Comme limite, il est probable que ces tests ne devront pas être utilisés au pic de lactation, pour limiter l'effet dilution.

Le test ELISA ParaCheck (développé par Antel BioSystems, et distribué par Prionics) est à ce jour le seul à avoir été approuvé pour le dépistage sur le lait par le Département de l'Agriculture américain (Dans le cadre du Programme de Contrôle Volontaire de la Maladie de Johne (*US Voluntary Johne's Control Program*)).

Le test ELISA de l'Institut Pourquier est également validé pour cette indication en France (van Weering, H. *et al.* 2007).

Lors d'une étude à grande échelle portant sur les caractéristiques et performances du test, la sensibilité et la spécificité ont été testées aux Pays-Bas en fonction du niveau d'excrétion, mais également dans des troupeaux supposés sains, à partir d'échantillons de lait (individuels ou de mélange).

II.3.2.4.1.3.1. Lait individuel

La spécificité (n=435) est supérieure à 99,8% (IC 95% : 99,3-100%), à condition de prendre une valeur *S/P* de 20%, au lieu de la valeur *S/P* de 30% proposée par le fabricant.

En comparaison avec les animaux séropositifs (n=418) (trousse ELISA Pourquier également), la sensibilité relative pour des échantillons de lait individuel est de 87% avec une valeur *S/P* de 20%, et de 80% avec une valeur *S/P* de 30%.

La sensibilité de cet ELISA, en comparaison avec la culture fécale, apparaît supérieure à 90% chez les forts excréteurs (97%, IC 95% = 90-100%), que ce soit à partir du sérum ou du lait. Tous les excréteurs réunis, la sensibilité relative du test est de 89% (IC 95% = 79-99%).

La concordance entre les 2 tests (sur le lait ou sur le sérum) apparaît également très grande ($\kappa = 0,91$).

II.3.2.4.1.3.2. Lait de mélange

La spécificité du test est de 100%, que la valeur *S/P* soit de 12,5% ou de 30% (n=113).

En conservant la valeur *S/P* proposée par le fabricant (30%), lorsque 2 animaux au moins sont séropositifs, la sensibilité est de 24%, et la spécificité de 99% par comparaison avec les résultats sérologiques (n=383 lait de mélange).

En optant pour une valeur *S/P* de 12,5%, et si la séroprévalence est $\geq 3\%$ au sein du cheptel, la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 85% et 96%.

Les différentes valeurs de sensibilité et de spécificité obtenues en fonction de la prévalence sérologique réelle au sein du cheptel, ainsi que de la valeur *S/P* choisie, sont données en exemple dans le Tableau 7.

Les auteurs concluent que l'utilisation individuelle des échantillons de lait est tout à fait pertinente, mais qu'une utilisation à grande échelle sur du lait de tank demande des évaluations supplémentaires (concernant notamment la valeur *S/P* à utiliser).

Tableau 7 : Sensibilité du kit ELISA Pourquier pour une utilisation sur lait de mélange

Prévalence sérologique au sein du cheptel	Valeur S/P 30%		Valeur S/P 12,5%	
	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
= 1 animal (62)	14	100	35	99
≥ 2 animaux (54)	24	99	52	96
≥ 2% (82)	17	99	39	96
≥ 3% (50)	28	99	85	96
≥ 4% (32)	38	99	69	94
≥ 5% (22)	50	99	72	92

Entre parenthèses, nombre de prélèvements de lait de mélange testés correspondant au critère. (n total = 383)

La méthode ELISA apparaît donc plus sensible que les deux autres tests mettant en évidence la réaction immunitaire à médiation humorale, que sont l'immunodiffusion en gel agar et la méthode de fixation du complément. Elle possède (existence de données contradictoires) les mêmes résultats chez les bovins, ovins et caprins, et peut être utilisée avec une sensibilité assez comparable à partir d'échantillons de lait ou de sérum.

II.3.2.4.2. Sérologie : immunodiffusion en gélose

Cette méthode est réalisée sur un gel à 1 % d'agarose (pH 9) ; la présence d'une ligne de précipitation est considérée comme un résultat positif, son absence comme un résultat négatif.

La technique (Sherman, D.L. *et al.* 1989) présente l'avantage d'être peu coûteuse, permettant la confirmation rapide d'une suspicion de paratuberculose clinique dans un troupeau.

Il s'agit cependant d'un test peu sensible (la sensibilité est trois fois moindre que celle de la culture fécale chez les sujets en phase sub-clinique), bien que très spécifique.

Il existe un kit commercial : Rapide Johne's Test®, ImmuCell

II.3.2.4.3. Sérologie : test de fixation du complément

Ce test, permettant de mettre en évidence des Ac dirigés contre *Map*, est aujourd'hui moins utilisé, à la faveur de la méthode ELISA. Les antigènes utilisés sont des antigènes solubles.

Ce test reste toutefois préconisé pour la confirmation d'un cas clinique ou pour détecter des animaux fortement excréteurs.

Certains pays continuent à l'exiger avant d'autoriser l'importation de bétail.

Cette méthode présente néanmoins l'inconvénient d'être tardive (une réaction positive ne se déclarera au minimum que 9 mois après la contamination, donc non utilisable dans un but de dépistage précoce), d'être inefficace pour la détection des animaux excréteurs asymptomatiques, et de présenter des réactions croisées avec d'autres bactéries.

Sa spécificité moyenne varie de 46 à 59% (72 à 87% pour un animal en phase clinique avancée).

Ainsi, lors de la première coproculture, 70 % des animaux testés ont une réaction négative en fixation du complément.

Ce test manque de sensibilité (**sensibilité moyenne inférieure à 50%**), voire de spécificité dans certains cas ; il n'offre aucune garantie sur le statut individuel des animaux dans un troupeau.

Parmi les méthodes sérologiques, les qualités de la fixation du complément se situent au-delà de l'immunodiffusion en gélose, mais en deçà de l'ELISA.

II.3.2.4.4. Test sérologiques : quelles combinaisons possibles ?

De nombreux auteurs estiment (Collins, M.T. *et al.* 2005 ; Böttcher, J. *et al.* 2004) que la combinaison de plusieurs tests, principalement sérologiques, permettrait d'augmenter l'efficacité des dépistages de la paratuberculose, tant à l'échelle individuelle qu'à l'échelle du troupeau.

Ce fut notamment réalisé dans le cadre du dépistage de la brucellose (ELISA, test de fixation du complément, séro-agglutination) ou bien encore celui du dépistage de la Leucose Bovine Enzootique (ELISA, immunodiffusion).

Pour la paratuberculose, certains auteurs proposent d'utiliser en première intention le test montrant la plus forte sensibilité. Consécutivement à cela, les animaux séropositifs devront être confirmés par au moins deux des tests les plus spécifiques.

Des méthodes de dépistage individuel et à l'échelle du troupeau, reposant sur la succession de plusieurs tests sérologiques, seront proposés plus en avant dans ce travail.

II.4. Bilan

II.4.1. Données pour les bovins

De toutes les méthodes de diagnostic ou de dépistage actuellement disponibles, aucune ne peut être considérée comme idéale, ou ne présente toutes les qualités requises pour obtenir des résultats totalement fiables (c'est-à-dire une sensibilité et une spécificité proche de 100 %).

Pour pallier aux inconvénients des différentes méthodes, diverses solutions sont possibles, certaines ayant d'ores et déjà été testées, voire mises en place :

- Il est notamment possible de faire varier les seuils de positivité (sérologie ELISA, test IFN, ...), de manière à privilégier la sensibilité ou la spécificité, selon le stade supposé de l'infection, ou le but poursuivi (dépistage ou confirmation clinique).

- la répétition, ou l'utilisation successive de différents tests (comparaison du résultat de différents kits de sérologie ELISA dans le dépistage de la paratuberculose ; confirmation d'une infection clinique par une méthode de culture fécale, ou l'analyse histopathologique d'un prélèvement d'iléon antérieur).

Tableau 8 : caractéristiques et qualités des principaux tests utilisés dans le cadre du diagnostic de la paratuberculose

Méthode	Précocité	Spécificité	Sensibilité ¹	Délai de réponse	coût	Application pratique	conclusion
Bactérioscopie	la plus tardive	43 à 94% (détecte tous les baar)	- 24 à 67 % - LD : 10 ⁵ -10 ⁶ bacille / g	court	7 à 9 €	-confirmation clinique -inefficace pour dépistage	utilisable en phase clinique avancée
Histopathologie	très précoce, dès les premières lésions	100%	85%	long	Elevé	- seul test effectif sans signe clinique (dépistage infectés asymptomatiques) - par biopsie ou prélèvement nécropsique	- non utilisé en dépistage
Coproculture ²	précoce, jusqu'à 2 à 4 ans avant signes cliniques	100%	- 50 % en moyenne - 40 à 60% en subclinique - 60 à 95 suivant phase clinique - LD : 50-100 bacilles/g	très long, jusqu'à 18 semaines	14 à 20 €	- examen semi quantitatif possible - dépistage infectés excréteurs asymptomatiques - diagnostic clinique	considéré comme la méthode de référence à ce jour
PCR simple ³	identique coproculture	- proche de 100%, mais discutée - augmente avec la PCR en temps réel et multiplexe	- comparable à la mise en culture - LD : 50germes/g	quelques heures	25 à 28 €	- diagnostic, dépistage infectés excréteurs asymptomatiques - utilisable sur fèces et lait - met en évidence souches non cultivables	- peu utilisé en pratique, tend à se développer
Directe							

Méthode		précocité	spécificité	Sensibilité ¹	Délai de réponse	coût	Application pratique	conclusion
Indirecte, mesure de la réaction immunitaire à médiation cellulaire	Test interférons Gamma	Précoce, avant apparition signes cliniques	26 à 97,6%	21 à 65 % (baisse avec apparition signes cliniques : anergie)	72 heures	?	- Dépistage (dont infecté asymptomatiques non excréteurs) - fortes contraintes (temps, conservation) - TCI et IDTc non recommandés et réalisés en pratique	- A associer avec des méthodes sérologiques - peu à pas utilisé à ce jour
Indirecte, mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale	Sérologie ELISA ⁴	intermédiaire	Supérieure à 99,8 %	-sensibilité moyenne : 53% (donnée laboratoire) - 9,2% pour les faibles excréteurs - 81,7 % pour les forts excréteurs	court	3 à 6 €	- Diagnostic clinique (risque d'anergie sérologique) - dépistage collectif, voire individuel, principalement des infectés asymptomatiques excréteurs	Réalisable à grande échelle dans des délais raisonnables
Indirecte, mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale	Fixation du complément	Tardive (confirmation clinique)	- spécificité moyenne : 46 à 59% - 72 à 87 % en phase clinique avancée	Inférieure à 50%	Court	4 à 5 €	Confirmer confirmation clinique	Rarement utilisé (remplacement par la sérologie ELISA)

¹ : rappelons que la sensibilité des différentes techniques est majoritairement estimée en fonction du statut excréteur (la méthode de référence étant la coproculture), elle apparaît donc supérieure à la sensibilité réelle pour détecter l'infection paratuberculeuse.

² : la mise en culture de *Map* est réalisable à partir d'échantillons tissulaires, avec des protocoles et qualités similaires

³ : méthode basée sur la détection de la séquence *IS900*

⁴ : les sensibilités et spécificités citées sont celles obtenues avec le kit ELISA majoritairement utilisé en France (distribué par l'Institut Pourquier)

II.4.2. Evaluation de ces données pour les ovins et caprins

Peu de données sont actuellement disponibles sur les qualités des tests utilisés chez les petits ruminants, ces tests étant généralement conçus pour l'espèce bovine ; pourtant, pour une utilisation optimale de ces tests, ces données sont indispensables à plusieurs points de vue : objectifs différents dans ces espèces (information sur le groupe plutôt que l'individu), souches différentes (souche ovine).

L'utilisation des tests pour le diagnostic de la paratuberculose clinique chez les caprins a été étudiée par Munjal *et al.*, après infection expérimentale de 10 animaux (*Goat1* à *G10*), 5 étant laissés à leur contact (*G11* à *G15*) et 8 servant de témoins négatifs (*G16* à *G23*) (Munjal, S.K. *et al.* 2007).

Les conclusions doivent être nuancées à cause du faible nombre d'animaux inclus dans l'étude, et le fait qu'aucune comparaison de sensibilité/spécificité par rapport à une utilisation chez les bovins n'est réalisée. Les valeurs de ces 2 caractéristiques analytiques demeurent donc des approximations par analogie.

- Des lésions histologiques sur l'iléon, le jéjunum et dans les nœuds lymphatiques mésentériques, furent détectées sur 5 animaux inoculés, entre les jours 60 et 270 post-infection.

- Pour les méthodes directes, les matières fécales (prélèvements mensuels) et les échantillons tissulaires d'un caprin infecté (sur 10 animaux inoculés) ont été positifs en culture à 210 jours post-infection. Deux animaux dont celui-ci furent positif en PCR (*IS 900*), 210 jours après infection.

Cette étude montre ainsi que l'histopathologie a une capacité supérieure à détecter les caprins en phase sub-clinique, par rapport aux méthodes microbiologiques.

Par ailleurs, de nombreux auteurs constatent que les cultures fécales sont négatives chez les ovins et les caprins, même à un stade avancé de la maladie (la souche ovine est difficilement cultivable, et la difficulté de mise en évidence par la technique PCR est probablement liée à des formes paucibacillaires.).

- Pour le test de transformation lymphoblastique utilisant la johnine (méthode indirecte mesurant la réponse immunitaire à médiation cellulaire, prélèvement tous les 2 mois), 11 prélèvements ont été positifs entre 60 et 270 jours après infection. ; en outre, 5 prélèvements du groupe contact ont été positifs entre 120 et 270 jours post-infection.

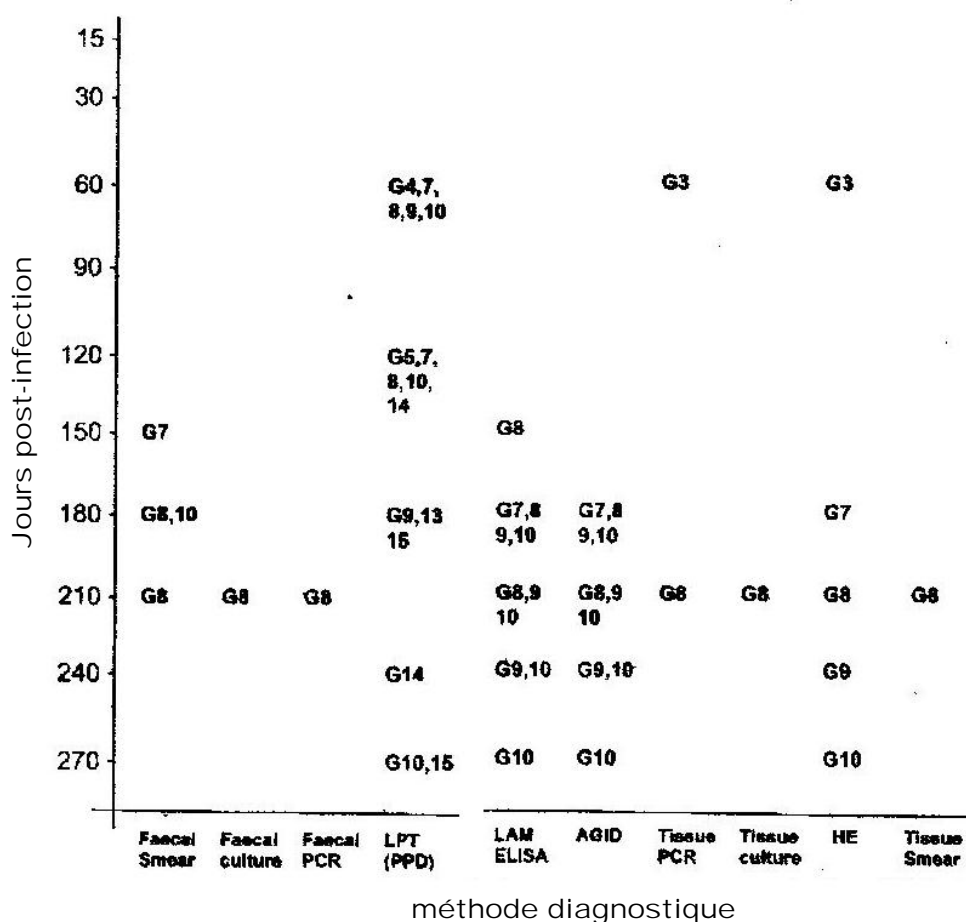
Il peut s'agir de résultats faussement positifs, ou bien ces animaux se sont contaminés au contact des premiers.

- Concernant les méthodes indirectes mesurant la réponse immunitaire à médiation humorale (prélèvement mensuel) : par la méthode d'immunodiffusion en gélose, 6 animaux ont été détectés après 180 jours ; alors que 11 ont été détectés à partir de 150 jours, par la méthode ELISA (test Svanovir®, antigène *Polysaccharide lipoarabinomannan (LAM)*). La méthode ELISA apparaît donc légèrement plus précoce et sensible.

Tous les animaux positifs (5 caprins) en sérologie avaient des lésions histologiques, et aucun n'appartenait au groupes contact ou contrôle (Munjal, S.K. *et al.* 2007).

La concordance entre les différentes méthodes utilisées est présentée à la Figure 11.

Figure 11 : résultats positifs obtenus avec les diverses méthodes diagnostiques chez les caprins (Goat 1 à 15) (Munjal, S.K. *et al.* 2007)



Le dépistage de la paratuberculose sub-clinique reste donc, dans l'espèce caprine comme dans l'espèce bovine, difficile en utilisant les tests de laboratoire disponibles.

La culture et la PCR ont une faible capacité de détection.

Les méthodes sérologiques ELISA et immunodiffusion, bien que tardives, apparaissent ici comme les plus efficaces.

III. MESURES DE LUTTE ET DE PREVENTION CONTRE LA PARATUBERCULOSE EN ELEVAGE BOVIN

Au sein de cette dernière partie, nous ciblerons plus spécifiquement notre analyse au contexte de l'élevage bovin, laitier ou allaitant.

Comme nous l'avons signalé plus en avant dans ce travail (cf. I.1.2.1.2.1), la paratuberculose bovine (et il en est de même chez les petits ruminants) est actuellement largement répandue en France (rappelons également que la situation est jugée comme préoccupante dans 60 % des départements), et ce aussi bien dans les élevages laitiers qu'allaitants, avec des conséquences économiques majeures.

Ces pertes sont à la fois directes (mortalité, euthanasie des malades cliniquement atteints, baisse de production (en terme de quantité de lait livrée en élevage laitier, ou de perte de poids de carcasse, voire de GMQ pour les bovins à l'engrais, dans les élevages allaitants), coût des traitements dont l'utilité est médiocre, et des examens paracliniques) qu'indirectes (nonaccès à certains débouchés commerciaux par exemple).

Ces pénalités économiques touchent autant l'éleveur traditionnel que des secteurs plus spécifiques (vente de géniteurs d'élite, insémination artificielle, transfert embryonnaire...).

Comme conséquence de l'impossibilité légale d'abattre un animal malade, ainsi que des crises successives du marché de la viande, l'impact de la paratuberculose clinique augmente perpétuellement.

On peut même actuellement considérer que dès l'apparition des premiers signes cliniques, un bovin atteint de paratuberculose a pratiquement perdu toute valeur marchande.

En effet, le marché pour les animaux insuffisamment finis est de plus en plus restreint, voire inexistant, leur destination devenant bien souvent l'équarrissage.

En conséquence, outre les pertes de production, la valeur marchande de l'animal disparaît bien souvent avec les premiers signes cliniques

Ainsi, le contexte actuel, qui est difficile pour l'élevage bovin, du fait de l'augmentation de l'exigence des éleveurs en terme de garanties sanitaires vis-à-vis des maladies, de l'augmentation très vraisemblable de la vigilance des éleveurs en matière de paratuberculose dans un proche avenir, stimule les actions concrètes et organisées contre la paratuberculose des bovins, que ce soit en matière de lutte ou de qualification sanitaire des cheptels, et cela sans même aborder la question d'un possible pouvoir zoonotique de l'agent de la paratuberculose bovine.

Une lutte sanitaire contre la paratuberculose des bovins plus efficace, ainsi qu'une certification des cheptels français vis à vis de cette maladie, pourraient donc devenir un des enjeux sanitaires majeurs de la filière bovine.

III.1. Contexte international

Il faut rappeler que la France fut le premier pays à organiser un contrôle de la paratuberculose des ruminants domestiques, dans les années 1920, notamment par la voie de la vaccination ; ce premier plan fut interrompu dès les années 1930, à la suite des interférences avec les plans d'éradication de la tuberculose bovine.

La paratuberculose est présente sur tous les continents, mais semble à ce jour concerner plus particulièrement l'Europe (dans la partie septentrionale du continent, c'est-à-dire La Grande-Bretagne, les Pays-Bas, la Belgique, les pays scandinaves et la France) et l'Amérique du Nord pour l'élevage bovin

La paratuberculose ovine, quant à elle, est également largement présente en Nouvelle-Zélande, mais également en Australie depuis la dernière décennie, et où elle continue de se propager très rapidement.

De ce fait, de plus en plus de pays commencent à se préoccuper de la paratuberculose, que ce soit dans le but de maintenir un statut favorable (cas de la Suède), ou bien d'instaurer des plans de maîtrise afin de limiter l'extension de cette maladie, voire de l'éradiquer.

En janvier 2001, la Fédération Internationale de Laiterie a organisé un symposium international avec le soutien de l'OIE, portant sur la maîtrise et le diagnostic de la paratuberculose, et au cours duquel plusieurs pays ont présenté leur approche.

Au sein de cette dynamique, certains pays ont réfléchi à la possibilité de mettre en place des plans de certification des cheptels, ou du moins aux précautions à prendre pour limiter la propagation de la paratuberculose.

C'est notamment le cas des Etats-Unis, des Pays-Bas et de l'Australie, mais également de l'Allemagne, de la Grande-Bretagne (notamment à travers le *Guidance on control of Johne's disease in dairy herds*).

Les modalités retenues par ces pays apparaissent toutefois différentes, tant sur le plan des techniques employées, du panel des animaux soumis au dépistage, ou des mesures de contrôle à l'introduction et des contre-expertises possibles.

Malgré les divergences, certains principes « fondamentaux » sont communs à toutes les propositions de certification :

- Compte tenu des particularités de cette maladie, il ne peut pas être établi une garantie « indemne de paratuberculose »
- Les certifications conférées sont à niveau progressif (4 à 10 niveaux selon le pays), reposant sur une probabilité croissante de non-infection du cheptel, au fur et à mesure de l'accumulation des résultats négatifs des tests successifs réalisées à intervalles réguliers.
- Des possibilités de contestation/confirmation des résultats positifs (procédures de contre-expertise), tenant compte des défauts de spécificité des techniques (notamment la sérologie ELISA).

De même, en tenant compte des connaissances actuelles, la majorité des mesures préventives sont communes à tous les contextes de certification ; notamment l'absence de contact direct ou indirect (via l'eau, le fumier ou l'alimentation) avec d'autres espèces sensibles (afin d'englober également le rôle épidémiologique potentiel de la faune sauvage) ; une visite d'élevage préalable obligatoire pour déterminer les facteurs de risques propres à l'élevage considéré, concernant la contamination et la propagation de *Map*, pour ensuite mettre en place des mesures préventives adaptées.

Au final, le contexte international de lutte/prévention contre la paratuberculose des ruminants peut nous permettre de guider les mesures à appliquer en France, notamment à travers les premiers résultats disponibles dans divers pays. Les caractéristiques particulières de l'élevage français doivent nous pousser à ne pas seulement copier un plan d'assainissement étranger, mais bien de mener notre propre réflexion, pour proposer un plan de certification, ainsi que des plans de lutte contre la paratuberculose clinique, qui soient adaptés aux productions françaises, et à nos problématiques de terrain.

Par exemple, une mise en quarantaine d'une durée de 4 mois (durée prévue et obligatoire dans le plan de certification australien) ne serait ni raisonnable, ni réalisable dans le modèle de l'élevage français. De même, un schéma de certification allemand à 10 niveaux (Benedictus, G. *et al.* 2000), allant d'un statut « supposé non-infecté », à infecté en passant par un statut « inconnu », semble trop lourd à appliquer, et à gérer.

III.2. Lutte contre la paratuberculose clinique des bovins dans le contexte français

III.2.1. Fondements du Programme national pour la maîtrise de la paratuberculose en élevage bovin cliniquement infecté

Dans le cadre de cette lutte, un programme national pour la maîtrise de la paratuberculose en élevage bovin (laitier ou allaitant) cliniquement infecté (Frigiere, Y. 2002) fut mis en place en 1999 par le « Groupe de travail paratuberculose ».

Celui-ci est un programme commun de la Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires (SNGTV) et de la Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire du Bétail (FNGDSB).

Ce plan reposait alors largement, outre les 2 actions complémentaires que représentent la détection/réforme précoce des animaux excréteurs, et la maîtrise sanitaire des risques de contamination, sur la vaccination précoce des veaux.

Ce plan proposait une harmonisation des différents plans de lutte qui existaient à l'époque, au sein de certains Groupements de Défense Sanitaire (GDS) départementaux.

L'objectif raisonnable n'étant pas alors d'éradiquer l'infection paratuberculeuse au sein du troupeau concerné, mais de ramener celle-ci à un niveau économiquement acceptable (c'est à dire faible).

III.2.2. Outils diagnostics, déroulement des plans de lutte

Pour la détection et la réforme précoce des animaux excréteurs, les techniques de culture fécale et de sérologie ELISA étaient (et sont encore) utilisés, en fonction de différents critères décisionnels (tableau 9).


	Culture fécale	Critère de choix	ELISA
Critère majeur  Critère mineur	Importante	Atteinte clinique	Faible
	Elevé	Taux d'animaux positifs	Faible
	En faveur	Animaux positifs parmi les plus âgés	
	Important	Contact veaux-mères	Faible
		Elevage sélectionneur	En faveur

Tableau 9 : critères de choix pour la technique de dépistage des animaux excréteurs

La fréquence des dépistages est annuelle, sur tout ou partie du cheptel selon le plan mis en place ; la population à dépister est constituée des bovins âgés de plus de 24 mois, quel que soit le test utilisé.

Toutefois, si des cas cliniques sur de jeunes animaux âgés de 18 à 36 mois apparaissent dans le cheptel, la population des bovins âgés de 12 à 24 mois peut également être testée, au moins la première année.

A la suite de ces tests, les animaux supposés excréteurs doivent être réformés dans les 6 mois après les avoir isolés.

Les mesures sanitaires engagées, toujours en vigueur à l'heure actuelle, seront envisagées ultérieurement.

Concernant la mise en place du plan de maîtrise de la paratuberculose clinique, celle-ci ne peut (et ne doit pas) se faire de manière uniforme dans tous les élevages.

Ainsi, l'application du programme national nécessite tout d'abord une classification des élevages atteints (Tableau 10).

Celle-ci s'effectue en 3 catégories (lorsque la vaccination pouvait être utilisée jusqu'en octobre 2001, 4 catégories étaient distinguées), basées sur le taux d'atteinte clinique initial, ainsi que sur les caractéristiques des animaux en phase clinique.

Elevage	Définition	Signification
Type a	Premier cas de paratuberculose clinique sur un animal acheté depuis moins de 1 an et introduit dans un élevage qui n'a jamais eu aucun cas clinique depuis au moins 3 ans.	Paratuberculose d'achat La paratuberculose n'est pas, à priori, endémique dans l'élevage.
Type b	Premier cas de paratuberculose sur un bovin né dans l'exploitation ou sur un bovin acheté depuis plus de 1 an et aucun cas clinique dans les 3 années qui précèdent.	Paratuberculose endogène au sein du cheptel, mais en début d'évolution.
Type c	1 cas clinique par an au moins, pendant au moins 2 années ; ou au moins 2 cas cliniques sur 3 à 4 années dans un élevage de 40 bovins de plus de 24 mois.	Paratuberculose endogène, avec un taux d'atteinte moyen à fort.

Tableau 10 : classification des élevages vis-à-vis de la paratuberculose

A la suite de cette classification, les plans de dépistage annuels préconisés sont les suivants (Tableau 11).

		Population testée en				
Catégorie d'élevage	Technique d'analyse utilisée	Année 0 (A0)	Année 1 (A1)	Année 2 (A2)	Année 3 (A3)	Année 4 et suivantes (A4+)
Elevage c	Culture fécale de préférence	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois jusqu'à obtention de 3 C.F. ¹ négatives consécutives
Elevage c	Si ELISA	- Tous les bovins de plus de 24 mois - Si plus de 10% d'ELISA+, passer à la méthode de C.F. ¹ pour les analyses ultérieures	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois jusqu'à obtention de trois ELISA négatifs consécutifs
Elevage b	ELISA ou C.F. ¹	-Tous les bovins de plus de 24 mois - Si plus de 10% d'ELISA+, passer à la méthode de C.F. ¹ pour les analyses ultérieures	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois	Tous les bovins de plus de 24 mois jusqu'à obtention de trois ELISA ou C.F. négatives consécutives
Elevage a	ELISA ou C.F. ¹	Pas de dépistage	Pas de dépistage	Les bovins de 24 à 36 mois (bovins de 0 à 12 mois en A0)	Les bovins de 36 à 48 mois (bovins e 0 à 12 mois en A0)	Dans le cas où des animaux se sont révélés positifs en A2 ou A3, l'élevage passe en catégorie b et suit alors le protocole décrit ci-dessus.

¹ : Culture Fécale

Tableau 11 : Plans de dépistage annuels dans le Programme national pour la maîtrise de la paratuberculose en élevage bovin cliniquement infecté

Pour les élevages de catégorie b et c, si en début de plan, le taux de positifs en coproculture est supérieur à 10%, les animaux les plus vieux, et ceux dont l'excrétion est la plus forte (intérêt d'une analyse semi-quantitative) doivent être réformés en priorité.

Les autres animaux positifs devant alors être élevés à part du reste du troupeau, puis réformés selon les possibilités de l'éleveur.

III.2.3. Critères de sortie du plan de lutte

Les plans de maîtrise de la paratuberculose clinique s'achèvent lorsque :

- Aucun cas clinique n'a été détecté depuis trois ans
- Tous les bovins à contrôler ont obtenus deux cultures fécales négatives successives à un an d'intervalle
- Il n'y a pas eu de réforme d'animaux positifs en coproculture ou séropositifs depuis deux ans.
- Aucun bovin positif en coproculture ou séropositif n'est présent dans l'élevage.
-

III.3. Intérêts, possibilités et proposition d'un schéma de certification dans le contexte français

Dans la recherche d'un contrôle de la paratuberculose des ruminants, 2 points de vue distincts peuvent être envisagés :

- soit éradiquer totalement la paratuberculose, ce qui apparaît non seulement très incertain (il n'existe à ce jour aucun exemple de pays ayant réussi à éradiquer, ou même à restreindre significativement cette maladie sans utiliser la vaccination), mais aussi très onéreux (en effet cela passerait obligatoirement par le biais d'incitations financières, comme l'indemnisation lors de l'abattage...)
- soit par une certification la plus fiable possible pour un maximum de cheptels, complétée par un contrôle des cas cliniques de paratuberculose.

La deuxième solution devrait être choisie (et c'est l'option que nous retiendrons dans ce travail), les participants à la certification doivent savoir, dès le départ, quels résultats peuvent être attendus, et sous quelles conditions spécifiques. Notamment, un élevage ne sera que très difficilement « certifié indemne » de paratuberculose.

Une étape majeure des plans de contrôle et de certification, est la création d'un ensemble de cheptels **non-suspects** de paratuberculose, et cela dès que possible afin d'avoir un réservoir d'animaux supposés sains pour remplacer les animaux réformés pour cause de paratuberculose.

Avant d'appréhender la faisabilité au sein de l'élevage français d'un schéma de certification, voyons plus amplement les enjeux d'une telle procédure.

III.3.1. Les enjeux de la certification (Bonnet, J.N. et al. 2002)

III.3.1.1. Pour tout éleveur acquéreur

Dans un grand nombre de cas, la paratuberculose est introduite dans les cheptels par l'achat d'un animal infecté.

Or les tests de laboratoire disponibles, quelle que soit la méthode choisie, ne peuvent en aucun cas certifier qu'un animal pris isolément est indemne de paratuberculose.

Un niveau de garanti satisfaisant ne peut donc pas reposer sur un contrôle à l'introduction, mais s'appuiera plutôt sur des garanties en amont de cet achat. Le terme « indemne de paratuberculose », compte tenu des caractéristiques de la maladie, ne pourra pas non plus être utilisé à l'échelle d'un troupeau, on ne pourra certifier tout au plus que la « non infection du troupeau avec une probabilité élevée ».

La qualification du cheptel d'origine apporte donc une garantie optimale à défaut d'être maximale.

Les éleveurs les plus demandeurs d'une garantie en matière de paratuberculose, et qui représentent le moteur potentiel de cette certification, sont ceux :

- reconstituant leur cheptel après abattage total, le nouveau cheptel se constituant le plus souvent par l'achat soit de plusieurs lots, soit d'un troupeau entier. Ils souhaitent donc éviter d'introduire la paratuberculose au même titre que l'IBR, le BVD et autres maladies abortives.

- reprenant des cheptels dans le cadre d'une succession.

- ceux qui ont assaini leur cheptel infecté de paratuberculose au terme d'un plan souvent contraignant et coûteux.

III.3.1.2. Pour les filières spécifiques

III.3.1.2.1. Vente de bovins reproducteurs

Il est fort à penser que la demande de garanties va tout d'abord (ou plus rapidement) se mettre en place au sein des races classiquement confrontées à cette pathologie.

Par exemple, dans la race Limousine, les responsables en charge de cette race ont déjà réagi à ce problème puisque, après avoir incité leurs adhérents à s'investir dans la lutte contre cette maladie depuis plusieurs années, ils ont inscrit le suivi paratuberculose des cheptels dans le cahier des charges à respecter pour l'inscription au Herd-Book.

A l'instar de cette race, nombreux sont ceux attendant la mise en place de telles garanties, non pas dans le cadre trop restreint d'une race, mais dans un cadre national.

Le recours à ces garanties se situe bien évidemment à un niveau prioritaire pour les bases de sélection de certaines races, pour différentes raisons :

- La base de sélection diffuse un grand nombre d'animaux à partir d'un nombre restreint d'élevages, et à destination d'un grand nombre d'élevages. Ces élevages, outre la qualification génétique évidente, doivent dorénavant apporter des garanties sanitaires d'un niveau de garantie élevé.

En conséquence, dans les races pour lesquelles la garantie sur le statut infectieux vis-à-vis de la paratuberculose représente une nécessité pour l'acheteur, cet élément doit faire partie des garanties de haute valeur et considérées à leur juste mesure par le vendeur.

- De même, au-delà du risque de contamination du troupeau acquéreur, la valeur individuelle élevée de l'animal introduit implique une garantie supplémentaire quant à l'absence d'infection chez l'animal.

- Il faut ajouter que, dans ce cadre commercial, la qualification des cheptels rentre dans une procédure « d'assurance qualité » de l'élevage, et apporte ainsi une protection du vendeur vis à vis d'éventuels recours et litiges.

- Les divers intermédiaires du marché des reproducteurs sont également très intéressés par l'apport de garanties, ce qui correspond là aussi à une recherche de circuit de commercialisation où le risque de litiges est le plus faible possible.

A long terme, si aucune garantie n'est apportée vis-à-vis de la paratuberculose au sein des races (voire de toutes les races) pour lesquelles cette maladie est fréquemment diagnostiquée, cela risque de limiter la diffusion du progrès génétique par l'achat d'animaux vivants, mais aussi à un désintéressement des intermédiaires potentiels pour un marché où le risque en matière de litiges est désormais élevé.

A une moindre mesure, pour les élevages commercialisant un plus faible nombre d'animaux destinés à l'élevage, un premier niveau de garantie s'avèrerait utile, voire nécessaire pour répondre aux besoins de ce marché, avec un minimum d'investissement.

III.3.1.2.2. Insémination artificielle et transfert embryonnaire

Pour ce type d'échanges, la paratuberculose représente une réelle préoccupation tant sur le plan sanitaire qu'économique.

Différentes études ont mis en évidence (cf. I.2.3.2.1) la présence de *Map* dans la semence de taureau, en présence ou non d'une excrétion fécale, et de signes cliniques.

Même si la majorité des auteurs pensent, comme nous l'avons mentionné, que la dose infectieuse contenue dans une paillette est insuffisante pour infecter une femelle au moment de l'insémination, la filière de production de semence se doit d'apporter toutes les garanties et ne peut pas prendre le risque de diffuser la maladie par cette voie.

Les conclusions, dans le cadre de la transplantation embryonnaire (cf. I.2.3.2.2.3.) sont identiques, et ce malgré le très faible risque que *Map* soit transmis par cette voie à condition que les embryons soient décontaminés selon les recommandations de la Société Internationale du Transfert d'Embryon.

Par ailleurs n'oublions pas, qu'avant de développer les signes cliniques de la maladie, ces animaux présentent une sensibilité accrue aux infections secondaires, ainsi qu'une baisse de la production et de la qualité de la semence chez les taureaux.

Les pertes financières directes, allant d'une dizaine de milliers d'euros jusqu'à plusieurs millions d'euros, engendrées par la mort ou la réforme précoce d'un taureau d'insémination sont en sus de la perte du gain génétique espéré.

Ces taureaux sont en effet le fruit d'un programme de sélection génétique depuis souvent plusieurs décennies, et peuvent aussi, sur certaines races à faible effectif, représenter une part importante des ressources génétiques de la race.

Enfin, la paratuberculose pourrait dans l'avenir être responsable de la perte, fermeture de certains marchés à l'exportation. En effet, pour l'exportation de semence, le contrôle du statut de l'animal donneur est fréquemment exigé et cette exigence est souvent étendue à l'ensemble de la taurellerie.

Pour toutes ces raisons, la filière de reproduction assistée s'est d'ores et déjà engagée dans un plan de contrôle et d'assainissement en profondeur de la paratuberculose.

Ce plan repose d'une part sur un dépistage systématique et régulier des taureaux en centre de testage et au sein des taurelleries afin d'éliminer d'éventuels porteurs ou excréteurs de *Map*, et d'autre part sur la réalisation d'un double test (sérologie ELISA et PCR) sur les mères à taureau.

Ces contrôles à l'entrée de la filière risquent toutefois d'être associés à des erreurs par défaut, dans la mesure où un veau issu d'une mère indemne peut être infecté de différentes manières dans son environnement, plutôt que par excès.

L'attestation par un vétérinaire de l'absence de cas cliniques dans le troupeau d'origine n'apporte pas beaucoup plus de garanties.

La certification sanitaire proposée serait ainsi un moyen de pallier à la faiblesse de ce système.

Ainsi, une certification spécifique pour la paratuberculose avec différents niveaux de garantie représenterait une réelle avancée, tant pour les éleveurs que pour les diverses unités de sélection.

III.3.2. Modèles mathématiques mesurant la faisabilité et l'intérêt économique d'un programme de certification pour la paratuberculose

III.3.2.1. Faisabilité et intérêt économique d'un programme de certification vis-à-vis de la paratuberculose dans le contexte français

Afin d'évaluer ces paramètres, une étude portant sur l'intérêt économique d'un schéma de certification en France a été finalisée en 2003 (données économiques 2000), en association avec l'ACERSA (Association pour la Certification en Santé Animale), par l'utilisation d'une approche comparative de type coût/bénéfice (Dufour, B. *et al.* 2003).

En effet, de même qu'une simple transposition des schémas de certification étrangers ne pourrait être totalement efficace et réalisable dans le cadre de l'élevage bovin français, les

schémas de certification existants déjà en France (à l'exemple de l'IBR) ne peuvent être reproduits à l'identiques pour la paratuberculose (profil épidémiologique différent, qualités des tests diagnostique disponibles, ...)

Pour réaliser cette analyse, c'est le **point de vue de l'acheteur** qui a été pris en compte ; le **bénéfice** résultant de la non-introduction de la paratuberculose, le **coût** associé à l'achat d'un animal de remplacement, qui inclut le prix de la certification de l'élevage supporté par le vendeur.

Des élevages types ont été utilisés dans les modèles mathématiques :

- Elevage laitier : 40 vaches en moyenne (taux de renouvellement moyen de 33%), production moyenne de 5500 litres/lactation (avec présence des quotas), âge moyen au premier vêlage de 2, 5 ans. Les veaux mâles sont vendus à 8 jours.
- Elevage allaitant : 50 vaches en moyenne (taux de renouvellement moyen de 20 %), élevées de manière relativement intensive (en comparaison aux autres pays appliquant un schéma de certification), âge moyen au premier vêlage de 3 ans. Les veaux sont vendus à 6 mois.

Cette approche, appliquée aussi bien aux élevages allaitants que laitiers, se base sur une certification à 2 niveaux de garanties (L1 et L2 pour *Level 1* et 2), mise en place et utilisée pendant 15 ans.

L1 :

- Obtention : pas de cas clinique, ni de vaccination contre la paratuberculose depuis plus de trois ans. Il faut alors que tous les animaux de plus de 24 mois soient négatifs en sérologie ELISA.

- Maintien : si tous les animaux de plus de 24 mois introduits depuis le dernier contrôle sont négatifs, et si, tous les 2 ans, les animaux entre 24 et 48 mois appartenant au troupeau sont négatifs.

L2 :

- Obtention : élevages appartenant déjà à L1, avec en plus, 2 contrôles annuels négatifs successifs de tous les animaux de plus de 24 mois.

- Maintien : identique aux conditions de L1, sauf que le contrôle opéré tous les 2 ans concerne tous les animaux de plus de 24 mois.

Concernant les méthodes d'analyse, la sérologie ELISA est la seule méthode envisagée dans le modèle de certification proposé par les auteurs.

Par analogie, la sérologie ELISA est largement plébiscitée dans les divers schémas de certification, à cause de son prix plus faible par rapport aux autres tests, la possibilité de tester un grand nombre de sérums simultanément (technique automatisable), mais également l'obtention des résultats dans de brefs délais.

Selon les auteurs, l'efficacité des 2 niveaux de certification (c'est-à-dire la diminution du risque d'introduire un animal infecté, si celui-ci provient d'un élevage adhérent au schéma de certification) est de **95% pour L1 et de 99% pour L2**.

Au terme de cette étude, il a été considéré qu'un tel schéma de certification n'était pas rentable au sein de l'élevage français, d'un point de vue économique.

Les pertes économiques annuelles liées à un cas clinique de paratuberculose dans un élevage allaitant est estimé à 1905€, à 1940€ dans un élevage laitier (pour un animal en phase sub-clinique, la perte annuelle est estimée à 461€).

Toutefois, il semble nécessaire de réévaluer cette hypothèse dans le cadre actuel (moindre coût des analyses, possibilité de réaliser des analyses en mélange) et sur le long terme (conséquences d'un lien hypothétique avec la maladie de Crohn, en considérant les crises successives qui ont touchées le marché de la viande bovine).

Concernant les méthodes d'analyse choisies, l'intérêt des méthodes PCR et de la culture fécale a également été envisagé ; toujours selon les auteurs (données non publiées), l'utilisation de ces méthodes ne dégage pas de réel intérêt, notamment d'un point de vue économique.

Toutefois, les auteurs évoquent les risques de faux-positifs (manque de spécificité de la méthode ELISA), et les risques liés à la perte accidentelle de la certification dans les élevages concernés. Aucune mesure de contrôle ou de contre-expertise n'est proposée dans ce modèle ; cela conduirait à une augmentation du coût de la certification.

III.3.2.2. Autres modèles mathématiques estimant la faisabilité d'un plan de certification paratuberculose

Il est intéressant de noter que, en dehors du modèle français, d'autres auteurs ont proposé différents modèles mathématiques permettant d'estimer la faisabilité, et les effets de plans de contrôle, de certification dans le cadre de la paratuberculose des bovins.

L'importance de ces modèles s'explique par le fait que des études basées sur des données réelles recueillies dans des plans de contrôle effectués à long terme (plus de 20 ans) ne sont pas encore disponibles.

Le modèle suivant prend en compte le nombre de niveaux de qualification mis en place, les règles d'introduction choisies, l'existence d'une pression d'infection environnementale, ainsi que la sensibilité et la spécificité des tests. Le modèle opère sur une période de 25 ans (Ezanno, P. *et al.* 2005).

Comme attendu, selon le modèle, la prévalence globale de l'infection au sein des cheptels baisse plus rapidement si les achats sont réalisés uniquement dans le groupe démontrant le plus faible risque d'infection.

Toutefois, la faisabilité économique et pratique (offre animale suffisante par rapport à la demande) reste selon nous incertaine.

Le critère majeur des tests doit être la spécificité ; si les tests sélectionnés pour la mise en place de la certification ne montrent pas une spécificité proche de 100%, le schéma de certification devient irréalisable.

La spécificité est particulièrement importante dans les cheptels à très faible risque d'être infecté, dans le but d'éviter des résultats faux positifs, et les conséquences économiques qui en découlent.

Toutefois, dans le cadre de ces élevages à haut niveau de certification, il faut souligner la possibilité, si le premier test n'est pas spécifique à 100% (cas de l'ELISA), de confirmer les résultats positifs par un deuxième test spécifique à 100% (cas de la coproculture). Ce deuxième test s'accompagne néanmoins d'une perte de sensibilité.

Ainsi, avec l'utilisation de tests hautement spécifiques, les cheptels qualifiés pourront conserver leur statut dans le temps, et les cheptels « infectés non dépistés » (risque évalué à 0,4%) seront dépistés ou se négativeront progressivement (le modèle met en effet en évidence que dans les élevages à faible prévalence d'infection, il apparaît un équilibre entre le temps passé pour détecter les infectés, et le temps pour qu'ils se « négativent » par chance...)

Ce modèle met également en avant que les stratégies de dépistage-élimination seules ne suffisent pas pour réduire de manière significative la prévalence au sein des élevages. Cette fois, il s'agit de la sensibilité des tests diagnostics qui n'est pas suffisamment élevée pour détecter l'intégralité des animaux infectés.

Donc, si l'un des objectifs majeurs des programmes de contrôle et de certification pour la paratuberculose est bien d'augmenter le nombre de cheptels certifiés, les mesures d'élimination des excréteurs doivent impérativement être couplées à des mesures préventives qui sont relatives à la conduite d'élevage.

Le modèle mathématique de cette étude est soutenu par une étude plus ancienne (Collins, M.T. 1999), selon laquelle la chance qu'un cheptel soit indemne de paratuberculose augmente de 95 à 99,9% en 4 ans si les tests utilisés possèdent une sensibilité de 40% et une spécificité de 99,5%.

III.4. Propositions de conduite à tenir, améliorations possibles du modèle

La difficulté liée à la mise en place d'un plan de lutte contre la paratuberculose, mais aussi d'un schéma de certification quelqu'il soit, vient principalement du fait que les effets directs sur la productivité et le bien-être animal sont souvent masqués, voire pas pris en compte.

Ils peuvent alors apparaître comme insuffisants pour justifier un tel investissement dans un plan de contrôle, que ce soit aux yeux des éleveurs, des industriels de la filière agro-alimentaire ou des gouvernements.

Pourtant, pour une proportion croissante des pays concernés, les effets indirects de la maladie ne cessent de s'amplifier, résultant de la discrimination des marchés envers les cheptels dont l'infection est avérée, mais également des mesures de contrôle renforcées pour limiter la transmission.

Dans de telles circonstances, les éleveurs peuvent se montrer réticents, voire être opposés à coopérer avec un plan de surveillance qui pourrait révéler l'infection dans leur cheptel, en raison des conséquences économiques que l'on connaît.

En outre, comme ces plans de contrôle sont peu capables d'éliminer la maladie au sein d'un cheptel dans des brefs délais sans la mise en œuvre de mesures coûteuses et agressives, des mesures d'assistance et financières doivent être instaurées pour aider les éleveurs à relever ces défis . Ces démarches restent encore largement à développer.

Dans le cadre d'un tel plan de contrôle national de la paratuberculose, une première démarche majeure réside dans la « ségrégation » des cheptels bovins (et de ceux de petits ruminants) en statut « Infecté » ou « Non Infecté ».

III.4.1. Propositions concernant le schéma de certification

III.4.1.1. Adaptation aux petits ruminants

Etant donnée la régionalisation assez marquée des bassins de production en élevage de petits ruminants, tant caprins qu'ovins, ainsi que la répartition observée de la paratuberculose dans ces espèces (cf. I.1.2.1.2.1), il semble intéressant de développer des plans de certification plus spécifiques en fonction de l'espèce, en séparant petits ruminants/bovins par exemple. Ceci est motivé par le faible intérêt pour l'animal pris individuellement dans ces productions, la disparités des signes cliniques « habituels », dont la diarrhée chronique, chez les espèces de petits ruminants et enfin l'absence de validation des tests diagnostics disponibles en France pour ces espèces.

Un tel schéma de certification pourrait notamment s'inspirer des travaux réalisés en Australie, mais nous ne détaillerons pas cette question dans notre travail.

III.4.1.2. Remarques concernant le plan de certification proposé par l'ACERSA

Concernant le cadre général proposé par l'ACERSA, plusieurs remarques peuvent être formulées, portant principalement sur son organisation.

- 2 niveaux de sécurité sont proposés, ce qui, en regard des plans de certification appliqués à ce jour dans le monde paraît faible, ce d'autant plus que le *Level 1* se définirait plutôt comme les conditions nécessaires pour entrer dans un schéma de certification, et non un plan de lutte proprement dit : pas de cas clinique depuis plus de trois ans, tous les animaux de plus de 24 mois séronégatifs.

- 4 niveaux de certification sembleraient, toujours en comparaison de ce qui est fait dans le reste du monde, plus adaptés ; ces 4 niveaux proposent une baisse croissante du risque d'infection pour l'élevage au fur et à mesure des échelons.

Des modèles mathématiques devront définir les niveaux de sécurité (qui traduisent la probabilité de non-infection du cheptel par la paratuberculose) correspondants, et ajuster la durée et la périodicité des tests à proposer dans le schéma de certification en III.4.1.3., et l'accession aux différents niveaux.

- De plus, ce modèle étant basé sur le volontariat, aucune obligation ne doit inciter un éleveur à changer de niveau.

Chaque niveau correspond bien évidemment à une charge financière (et un surcroît de travail) , liée à la multiplication des tests.

Ainsi, le dernier niveau pourrait être destiné à des élevages sélectionneurs, voire certains vendeurs de reproducteurs à haute valeur génétique.

- L'utilisation nécessaire de tests de contre-expertise, du fait du manque de spécificité des tests ELISA par rapport à la culture fécale, engendrera un surcoût non négligeable.

Il serait peut être indiqué de ne pas réaliser de contre-expertise au sein des 2 premiers niveaux de certification, puis une culture fécale pour le niveau 3, et une culture fécale couplée à une PCR (certaines souches n'étant pas cultivables) pour le niveau le plus élevé (cf. infra pour la proposition d'application). En effet, la possibilité d'un résultat faux-positif, ou d'un animal infecté et non détecté (la sensibilité de la culture fécale n'est que de 40 à 60% au stade sub-clinique) auraient des conséquences économiques majeures dans un élevage au dernier niveau du schéma de certification.

- Pour le maintien du niveau L1, une sérologie ne concernant que les animaux entre 24 et 48 mois, et réalisé tous les 2 ans ne semble pas adapté à tous les types d'atelier, pour 2 raisons majeures.

- Premièrement, s'agissant des animaux concernés par le dépistage : si il est vrai qu'en élevage laitier, où l'intensification de la production est importante, les animaux déclarent souvent la pathologie de manière précoce (donc entre 24 et 48 mois), ce n'est pas le cas dans la majorité des élevages allaitants. Dans des élevages allaitants moins intensifs, ou de bon niveau zootechnique, les animaux sont parfois positifs plus tardivement, après l'âge de 5 ans, voire 10 ans dans quelques cas plus rares : le dépistage ne reflète donc pas le vrai statut sanitaire de l'élevage.

De plus, s'il est intéressant de réaliser des dépistages sur les animaux les plus jeunes dans certaines pathologies à circulation rapide (notamment les pathologies virales, telle que le BVD), ce type de méthodologie n'est pas adapté au cas de la paratuberculose.

A cause du temps de latence très long, il semble au contraire nécessaire de tester les animaux les plus âgés, ayant eu le temps de déclarer la maladie (ou du moins d'avoir une conversion sérologique), mais également de dépister les animaux plus jeunes qui seraient infectés, avant qu'ils ne deviennent excréteurs! Tous les bovins adultes (de plus de 12,24 ou 48 mois selon le choix) doivent donc être testés régulièrement.

- Deuxièmement, le fait de ne réaliser les dépistages qu' 1 an sur 2 est criticable : si un animal présente une séroconversion peu de temps après le dépistage (ou si il s'agit d'un animal de plus de 48 mois, qui n'aura donc pas été dépisté dans le modèle proposé), cela aurait non seulement des conséquences pour l'élevage, mais également pour les élevages qui auraient acheté des animaux durant ces 2 ans, en se fiant à un niveau de sécurité qui est en réalité erroné.

Dans le paragraphe suivant, nous proposerons des modifications pour rendre le programme plus efficace et le rendre le plus opérationnel possible.

III.4.1.3. Propositions de conduite à tenir

Rappelons avant tout, que dans le cadre d'un schéma de certification, ou bien d'un contrôle individuel lors d'une vente, un animal isolé de son contexte épidémiologique ne peut absolument pas être considéré comme indemne de paratuberculose ; le statut indemne ne pourrait, au mieux, s'appliquer qu'à l'échelle du troupeau.

Néanmoins, en pratique, les schémas de certification existants et ceux proposés, indiquent l'absence d'infection, avec cependant un risque faible et prédéterminé.

Les cheptels reconnus pour présenter un risque minimal résiduel d'infection par *Map*, qui forment le plus haut niveau de certification, seront d'une importance majeure car ils seront source de remplacement pour les autres troupeaux. Toutefois, l'identification de ces cheptels, enjeu de la certification, est difficile pour deux raisons majeures :

- Les tests de diagnostic disponibles pour détecter une infection à *Map* dans ces cheptels présentent une faible valeur prédictive négative, due à la faible sensibilité des tests. En outre, dans certains cas, les animaux peuvent être excréteurs avant l'apparition des premiers signes cliniques, voire avant l'établissement d'une réaction immunitaire de type humoral. Ainsi, de nouvelles infections peuvent apparaître avant que les premiers tests ne soient positifs.

- Les cheptels à faible risque montrent, de façon logique, un très faible niveau de prévalence en cas d'infection, et des tests de faible sensibilité auront donc une faible probabilité de les détecter.

Au final, même quand tous les tests individuels s'avèrent négatifs, un cheptel ne peut pas être qualifié comme « indemne de paratuberculose », mais seulement être classé à très faible risque d'infection.

Le risque serait que ces élevages vendent des animaux infectés à des élevages de même niveau de certification qu'eux, voire d'un niveau supérieur.

Concernant l'organisation proprement dite du plan de certification, une organisation à **4 niveaux de sécurité** semble être la plus appropriée, et la plus compréhensible ; la probabilité d'acquiescer la qualification « non infecté par *Map* » augmentant au fur et à mesure des tests successifs

Les différents niveaux qui pourraient être définis sont les suivants :

Figure 12 : Proposition d'un schéma de certification

Niveau de certification	Objectif	Mesures mises en place
Niveau 1	Accession	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de cas clinique de paratuberculose depuis 5 ans, ou de vaccination paratuberculeuse depuis 5 ans dans le cas où la vaccination serait de nouveau autorisée en France. - Sérologie négative sur tous les animaux de plus de 24 mois.
	Maintien	<ul style="list-style-type: none"> - Tous les 2 ans, sérologie sur tous les animaux achetés pendant la période, âgés de plus de 12 mois, ainsi que : <ul style="list-style-type: none"> • en élevage lait : tous les animaux entre 24 et 48 mois + 10% du cheptel parmi les bovins les plus âgés (soit 4 en moyenne) • en élevage viande : tous les animaux entre 24 et 60 mois + 10% du cheptel parmi les bovins les plus âgés (soit 5 en moyenne) - Achats : sérologie paratuberculose sur tout bovin de plus de 12 mois.
	Contre-expertise	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de mesure de contre expertise en cas de sérologie positive (si spécificité > 98%), ou aux frais de l'éleveur par coproculture dans un laboratoire habilité, dans un délai maximum de 45 jours. - Tout cas clinique ou bovin séropositif : sortie du schéma de certification.
Niveau 2	Accession	<ul style="list-style-type: none"> - Niveau L1 acquis. - Tous les animaux de plus de 24 mois séronégatif l'année n (année d'entrée au niveau L1) et l'année n+2.
	Maintien	<ul style="list-style-type: none"> - Sérologie sur 50% des bovins (comprenant les achats de l'année) de plus de 24 mois tous les ans (l'intégralité des bovins de plus de 24 mois devant être testée en 2 ans). - Achats : sérologie paratuberculose sur tout bovin de plus de 12 mois.
	Contre-expertise	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de mesure de contre expertise en cas de sérologie positive (si spécificité > 98%), ou aux frais de l'éleveur par coproculture dans un laboratoire habilité, dans un délai maximum de 45 jours. - Tout cas clinique ou bovin séropositif : sortie du schéma de certification.
Niveau 3	Accession	<ul style="list-style-type: none"> - 2 années au niveau L2 (soit 1 épreuve de maintien au minimum). - Sérologie négative sur tous les animaux de plus de 18 mois - Vérification de l'absence de contact direct ou indirect (via l'eau, l'aliment, le fumier) entre les espèces sensibles depuis au moins 2 ans
	Maintien	<ul style="list-style-type: none"> - Sérologie sur 50% des bovins (comprenant les achats de l'année) de plus de 18 mois tous les ans (l'intégralité des bovins de plus de 12 mois devant être testée en 2 ans). - Achats : sérologie paratuberculose sur tout bovin de plus de 12 mois
	Contre-expertise ¹	<ul style="list-style-type: none"> - En cas de sérologie positive, le détenteur a 45 jours pour faire réaliser un prélèvement pour culture fécale (la certification du cheptel est suspendue jusqu'à obtention du résultat). - Si la sérologie est positive avec absence de contre-expertise réalisée, ou si le résultat de cette contre-expertise est positif en paratuberculose : sortie du schéma de certification.

Niveau 4²	Accession	<ul style="list-style-type: none"> - Niveau L3 acquis depuis 12 à 14 mois minimum. - Sérologie négative sur tous les animaux de plus de 18 mois - Visite d'élevage pour une mise en place de mesures préventives dans le cadre de la paratuberculose bovine.
	Maintien	<ul style="list-style-type: none"> - Sérologie annuelle sur tous les bovins de plus de 18 mois - Tous les 2 ans, vérification de l'application des mesures préventives mises en place. - Achats : sérologie réalisée chez le vendeur de 15 à 30 jours avant le départ, puis à l'arrivée chez le vendeur (possiblement couplée à une PCR).
	Contre-expertise ¹	<ul style="list-style-type: none"> - En cas de sérologie positive, le détenteur a 45 jours pour faire réaliser un prélèvement pour culture fécale et PCR (la certification du cheptel est suspendue jusqu'à obtention des résultats). - Si la sérologie est positive avec absence de contre-expertise réalisée, ou si le résultat de cette contre-expertise est positif en paratuberculose : sortie du schéma de certification.

¹ : Pour les niveaux L3 et L4, si l'éleveur conteste les résultats de la contre-expertise, il devra faire réaliser une mise en culture de tissu, avec examen histologique de l'iléon (valvule iléo-caecale si l'animal est abattu), de ganglions mésentériques et iléo-caecal.

² : Le niveau 4, dont l'obtention est toujours basée sur le volontariat, est principalement destiné aux élevages sélectionneurs, ou vendeurs de reproducteurs de haute valeur génétique.

Les laboratoires qui réaliseront ces analyses, que ce soit lors du dépistage ou de la contre-expertise, devront être agréés.

Les achats ne pourront se réaliser qu'au sein de cheptels de niveau équivalent ou supérieur. Si un animal est positif à la sérologie d'introduction, l'acheteur aura 3 semaines pour faire repartir l'animal. Sans quoi l'élevage perdra sa certification.

Si l'acheteur achète un animal dans un cheptel de niveau inférieur, celui-ci aura 15 jours pour faire repartir l'animal, sans quoi il reviendrait au niveau de certification du vendeur, quel que soit son niveau initial (principe déjà utilisé dans le schéma de certification des Pays-Bas).

Toutefois, une réserve doit être apportée sur la validité du schéma proposé, bien que cela ne puisse être vérifié dans ce travail.

Le nombre d'années requis pour obtenir une certification dans un niveau de garantie élevé doit être mis en balance avec la faisabilité financière (coût de mise en place, coût des analyses pour l'éleveur...) ; de même, la probabilité de non-infection correspondant à chaque niveau (assimilable à un « niveau » de sécurité) n'a pas été déterminée. Cela nécessiterait l'utilisation de modèles mathématiques adaptés.

Les apports de cette modélisation pourra engendrer des modifications, notamment sur la durée et la périodicité des tests de dépistage, ainsi que l'accession et le maintien aux différents niveaux.

Sur le plan des méthodes d'analyse choisies, la réalisation des dépistages par ELISA sur le lait, dans le élevages laitiers, permettrait de systématiser les analyses, de limiter les frais de prélèvement, et ainsi de diminuer les coûts du dépistage ; rappelons que même si aucune

trousse n'est actuellement validée en France, au moins deux sont potentiellement utilisables (cf. II.3.4.1.2.) : le test ELISA ParaCheck, approuvé pour une utilisation sur le lait par le Département de l'Agriculture des Etats-Unis, ainsi que le test ELISA de l'Institut Pourquier déjà validé pour cet indication en France.

De même, pour la certification des élevages allaitants, la validation de sérologies de groupe, sans diminution de la sensibilité, serait intéressante d'au point de vue économique, mais également pratique (moins de manipulations).

III.4.2. Propositions concernant les plans de lutte

III.4.2.1. Possibilités de utiliser une combinaison de tests de diagnostic

III.4.2.1.1. Combinaison de plusieurs tests sérologiques ELISA

La possibilité d'établir un plan de lutte reposant sur l'utilisation d'une combinaison de tests sérologiques, a été étudiée en utilisant des tests ELISA commercialement disponibles (Böttcher, J. *et al.* 2004).

La méthode sérologique ELISA est actuellement considéré comme le test le plus adapté aux plans de certification (l'ACERSA l'a choisi dans la proposition de certification paratuberculose), en combinaison avec la culture fécale dans les campagnes de lutte.

Toutefois, les tests existant actuellement souffrent principalement d'un manque de spécificité ; c'est pourquoi la possibilité de multiplier les tests de diagnostic sérologique a été envisagée.

Pour l'appliquer, et afin d'établir des conclusions valides, avec une combinaison de tests, il est nécessaire de suivre une démarche rigoureuse, reposant sur une bonne connaissance des caractéristiques des test qui seront utilisés.

Les auteurs ont essayé de définir les avantages à associer plusieurs tests, tant du point de vue individuel (le plus difficile à appréhender à ce jour), que du point de vue collectif.

Les tests utilisés dans cette étude sont les kits distribués par Svanovir (Sv), Idexx (Id) et Pourquier (Pq) (synthèse des caractéristiques en II.3.4.1.2.).

III.4.2.1.1.1. Comparaison des résultats obtenus avec les différents tests

Avant toute utilisation, la concordance entre les différents tests envisagés a été analysée à l'aide d'un tableau de contingence. Les résultats sont présentés ci-après :

Tableau 12 : tableau de contingence entre les 3 tests de sérologie ELISA

Test ELISA	Id		Pq	
	Négatif ¹	Positif ¹	Négatif	Positif ¹
Sv				
Négatif ¹	2082 (2074)	4 (12)	2076	10
Positif	626 (562)	36 (100)	639	23
Id				
Négatif ¹			2688 (2620)	20 (16)
Positif ¹			27 (95)	13 (17)

¹ : Différentes valeurs seuil étant proposés, les **résultats douteux** sont considérés comme Négatifs pour le kit **Sv**, Positifs pour le kit **Pq**. Pour le kit **Id**, les résultats douteux furent soit considérés comme Négatifs, soit comme Positifs (données entre parenthèses).

Les résultats obtenus par comparaison avec le test le plus sensible (Sv) sont les suivants :

- sur les 662 sérums Sv-positifs, 36 (5,4%) et 23 (3,4%) sont positifs en Id et Pq respectivement.
- sur les 2086 échantillons Sv-négatifs, 4 (0,4%) et 10 (0,5%) sont positifs en Id et Pq respectivement.

Dans la comparaison des tests Id et Pq, 13 des 40 sérums Id-positifs sont confirmés par Pq, tandis que 13 des 33 sérums Pq-positifs sont confirmés par Id.

Pour ces deux tests, 60 sérums ont été positifs avec l'un des deux kits, alors que seulement 13 (24%) le furent pour les deux tests (en considérant les résultats douteux avec le test Id comme positif, le nombre de sérums positifs dans l'un des deux tests double (128), alors que nombre de sérums positifs dans les deux n'augmente que peu (17, soit 13%).

Sur la base de ces résultats, 5 profils sérologiques peuvent être décrits à l'échelle des cheptels :

- profil A : cheptels dans lesquels des animaux sont positifs avec les trois tests.
- profil B : cheptels dans lesquels des sérums sont positifs avec le kit Sv (soit le plus sensible), et l'un des autres tests.
- profil C : positivité avec le kit Sv, combiné avec un résultat douteux avec Id
- profil D : positivité uniquement avec le kit Sv.
- profil E : cheptels douteux ou négatifs avec le kit Sv.

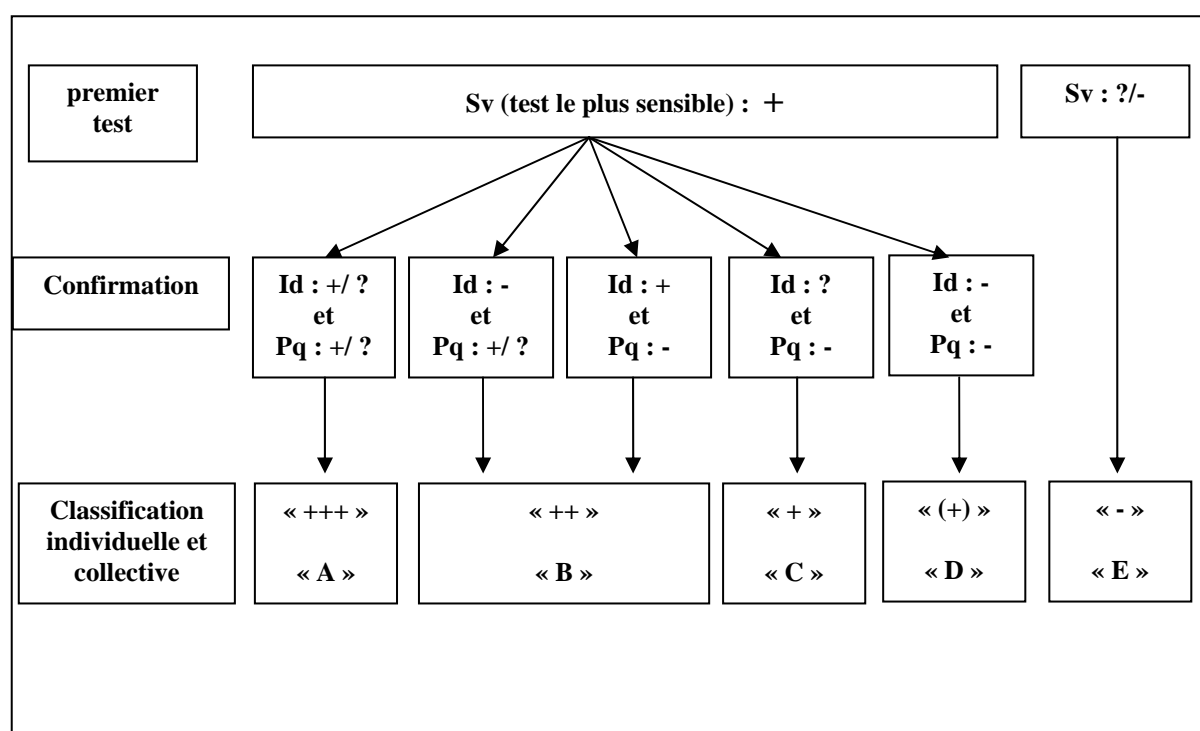
III.4.2.1.1.2. Proposition d'utilisation de l'analyse sérologique combinatoire et résultats observés

Pour des raisons économiques, les auteurs jugent irréalisable de tester chaque sérum avec les 3 kits, une méthode de testage simplifiée est donc proposée.

Chaque sérum est tout d'abord testé avec le kit Sv, test possédant la plus forte sensibilité. Les sérums positifs sont alors testés à nouveau avec chacun des 2 autres kits, montrant une plus forte spécificité (présence d'une étape de préabsorption sur *M. phlei*).

Cette stratégie de testage sérologique combinatoire conduit ainsi à classer les cheptels de « A à E », et les résultats individuels de « +++ à - » (qui représente la probabilité que l'animal soit infecté).

Figure 13 : proposition d'une méthode de combinaison des tests sérologiques ELISA.



Les auteurs soulignent que la classification proposée présente une bonne corrélation avec les observations du terrain : alors que 4 des 6 cheptels classés en A ont eu des cas de paratuberculose dans le passé, seul 1 des 99 cheptels classés de C à E ont déclaré un cas de paratuberculose dans le passé.

Dans 87% des cheptels où la prévalence observée est supérieure à 30%, les tests plus spécifiques ont confirmé les résultats, alors que dans 28 % des cheptels avec une prévalence inférieure à 30%, cela n'a pas été le cas.

Toutefois, lors de cette étude, il faut remarquer que 22 sérums furent négatifs en Sv, et détectés par un des deux autres kits avec étape de pré-absorption ; **en pratique, ces animaux**

ne seraient pas détectés, puisque aucun autre test n'est prévu pour les animaux négatifs avec le test Sv.

Dix sérums furent détectés par Pq (5 positifs, 5 douteux), 12 par Id (4 positifs, 8 douteux), soit environ 0,4% des sérums qui réagissent sans avoir préalablement été positif avec le kit Sv.

Or, certains de ces résultats furent obtenus dans les classes D voire E, considérées dans le protocole proposé comme les moins à risque. Il s'agit là d'un écueil possible et important ; cette méthode ne permettra donc pas de supprimer la répétition annuelle des tests.

Le premier test ELISA utilisé doit donc être le plus sensible possible, la spécificité étant apportée par les 2 tests ultérieurs.

III.4.2.1.1.3. Intérêts et désavantages de cette méthode

En accord avec la majorité des autres travaux, il apparaît clairement que le dépistage de *Map* au sein des cheptels sur la base d'un seul test ELISA n'est pas satisfaisant (en raison de la trop faible sensibilité de deux des trois tests, et le manque de spécificité du troisième test à l'origine de nombreux faux-positifs)

Bien que ne permettant pas de supprimer la répétition annuelle des tests de dépistage, cette méthode pourrait permettre, par un dépistage initial plus sensible des animaux séropositifs, et une estimation plus fine de la prévalence initiale de la maladie, de limiter la durée de la période d'assainissement, ou de mise en place de la certification.

Une économie peut-être dégagée par l'utilisation de cette méthode : lorsque l'incidence est forte dans un troupeau, les plans de lutte actuels préconisent (cf. III.2.2) l'utilisation de la culture fécale comme méthode de dépistage (méthode la plus spécifique, permettant également une analyse semi-quantitative des excréteurs, mais cependant beaucoup plus onéreuse et peu rapide...) ; l'approche par combinaison de tests telle qu'elle est proposée permettrait ainsi un gain de temps (par rapport aux 16 semaines nécessaires à la conclusion d'une culture fécale négative), un gain économique (encore renforcé par la première phase de sondage à l'aide d'un test très sensible), tout en conservant une bonne spécificité par la méthode sérologique combinatoire proposée.

Selon la classification proposée par les auteurs, une qualification semi-quantitative des animaux (de – à +++) serait également possible, permettant également l'élimination des animaux qui sont les plus à risque dans les situations où la prévalence est forte (++ et +++).

Néanmoins, notons qu'aucune donnée précise n'a été présentée pour assimiler cette classification individuelle au niveau réel d'excrétion. Ces informations seraient donc, selon nous, nécessaires à la mise en place de cette approche combinatoire.

Toutefois, pour conforter cette proposition, rappelons (cf. II.3.4.1.2.) que la sensibilité des tests sérologiques ELISA est d'autant plus forte, en probabilité, que l'animal excrète de façon massive : l'accumulation de réponses positives à l'aide des différents kits ELISA va donc ici dans le sens d'une forte excrétion.

L'autre avantage de cette méthode est de détecter des animaux non excréteurs (cf. II.3.4.1.2.). En effet, la présence d'animaux séropositifs non excréteurs peut être due à des animaux effectivement infectés, mais dont l'excrétion est inférieure aux limites de détection de l'isolement, ou n'excrétant pas le jour du prélèvement, ou bien encore d'animaux infectés,

mais plus résistants et n'excrétant pas ou de façon épisodique (cas de certains bovins allaitants en conditions zootechniques favorables, et n'exprimant la paratuberculose que très tardivement).

Cette méthode autoriserait donc en plus une détection des sujets à risque (intérêt de les suivre alors de manière périodique, cette fois par culture fécale).

Mais comme nous l'avons déjà précisé, l'existence de vrais faux-positifs restent également possible (relative par exemple à une exposition chez un adulte, alors plus résistant à l'infection, où la mise en place d'une immunité qui n'est pas forcément suivie d'une infection chronique). Les informations disponibles sur la physiopathologie de la maladie ne permettent pas de connaître la fréquence, ni l'existence de cette possibilité.

Comme autre avantage, lors d'achat (où le temps de réponse d'une culture fécale n'est que rarement compatible avec les capacités de mise en quarantaine), les étapes successives proposées pourraient intervenir comme une aide décisionnelle pour les éleveurs et les vétérinaires, devant les « niveaux » de positivité observés en pratique, ou la discordance entre les différents tests utilisés.

Malgré tout, en contradiction avec les auteurs, considérant l'ensemble des données disponibles sur la paratuberculose, il est peu probable que cette méthode soit suffisante pour prédire du statut « indemne » d'un animal. En aucun cas un animal ne pourra être certifié négatif, par exemple lors d'une transaction, quel que soit le test ou la combinaison de tests employés. Seul le statut de l'ensemble du cheptel peut alors être considéré.

Selon nous, avec l'appui d'études comparatives ultérieures qui seront nécessaires, cette méthode pourrait être utilisée :

- à l'ouverture (première année) d'un plan de lutte (dépistage plus large des animaux positifs ou à risque, estimation de la prévalence initiale)
- en remplacement de la coproculture lors du dépistage **à l'échelle du troupeau**, en cas de forte prévalence (notamment pour un délai de réponse plus court, la mise en évidence des plus forts excréteurs, la possibilité de détecter les futurs excréteurs ...). **Cependant, cette méthode ne remplace pas la coproculture dans tous les cas** (par exemple lors du suivi de potentiels futurs excréteurs), **mais semble plus indiquée à certaines étapes du dépistage. Toutefois, la coproculture demeure la méthode de référence.**
- lors d'achat d'animaux avant l'introduction.

III.4.2.1.2. Combinaison de tests directs et indirects

De même que pour la méthode de combinaison des tests ELISA que nous avons présentée dans le chapitre précédent, le but est de confirmer un premier résultat (obtenu par la technique la plus sensible possible), à l'aide d'une seconde technique d'analyse (la plus spécifique possible).

En France, les tests utilisés en première intention sont très souvent la sérologie ELISA, ou la bactérioscopie, les tests de confirmation étant la coproculture (test de référence, utilisé en dépistage, ou pour confirmation individuelle), l'histopathologie (confirmation d'un cas clinique sur animal mort), ainsi que la PCR qui tend à se développer malgré son coût.

Les qualités de ces associations étant largement utilisées et reconnues à l'heure actuelle, nous ne les détaillerons pas dans ce travail.

III.4.2.2. Lutte contre la paratuberculose dans les élevages avec une forte prévalence

Dans les élevages où la prévalence de l'infection paratuberculeuse est élevée, deux solutions sont possibles en théorie : soit l'éradication rapide de la paratuberculose passant par une élimination totale du cheptel, soit un contrôle progressif de la maladie sur le long terme.

Pour l'éradication rapide de l'infection, il faudrait obligatoirement passer par une réforme des animaux (abattage total du cheptel), suivi par une absence d'utilisation des pâtures, parcours et bâtiments d'élevage jusqu'à l'élimination progressive de tous les micro-organismes de *Map*. La dernière étape étant la ré-introduction d'animaux sains.

Ce premier choix est très difficilement réalisable en pratique : la durée de persistance extrême de *Map* dans l'environnement, les conséquences financières lourdes notamment liées à la période d'inactivité, mais aussi la difficulté actuelle à acheter des animaux sains, en l'absence d'une quelconque garantie sur le statut sanitaire vis-à-vis de la paratuberculose.

Pour un contrôle progressif, et efficace de la paratuberculose, deux actions majeures se dégagent, d'importance équivalente :

- réduire et limiter la transmission de *Map* (les méthodes de dépistage actuelles ne permettant pas de détecter précocement l'infection, il faut limiter au maximum les possibilités de contamination), par une maîtrise sanitaire des risques de contamination au sein du cheptel,
- détecter et éliminer le plus tôt possible les animaux excréteurs (afin de réduire le degré de contamination de l'environnement et la transmission aux animaux sensibles).

Sur le court terme, et d'autant plus que le taux d'infection est élevé, la mesure phare sera donc le dépistage et l'élimination des excréteurs et infectés (mesure dite offensive).

Les mesures préventives (pour réduire et limiter la transmission de *Map*), qui ont un intérêt majeur à moyen et long terme, seront appréhendées pour les élevages à faible niveau d'infection.

Si une de ces deux actions est négligée, on constatera au mieux une augmentation de la durée du plan de contrôle, le plus souvent un échec pur et simple.

III.4.2.2.1. Mesures alternatives à l'élimination des animaux infectés de paratuberculose

III.4.2.2.1.1. Traitement médical à visée curative

L'utilisation de corticostéroïdes a été envisagée, afin de limiter la réponse inflammatoire de l'hôte qui est exacerbée; aucun résultat probant n'a été obtenu et aucune amélioration ne peut être espérée. En outre, ce traitement va conduire probablement à une augmentation de l'excrétion.

III.4.2.2.1.1.1. Traitement à base d'antibiotiques

Une synthèse a été récemment publiée sur le traitement, tant curatif que préventif de la paratuberculose (Emery, D.L. *et al.* 2004).

Nous reprenons ici les éléments essentiels de cet article.

Différents essais thérapeutiques ont été décrits dans la littérature :

- un traitement quotidien pendant 6 mois (Zahinuddin *et al.* 1984) à base de sulfate de streptomycine (500 mg, IM), d'isoniazide (25 mg) et d'aminosalicylate de sodium (850 mg, VO) a permis une réduction de la diarrhée et la perte de poids, sans élimination de l'infection (Zahinuddin *et al.* 1984) .

- un traitement bi-quotidien administré pendant 85 jours à une chèvre avec des signes cliniques n'a pas non plus permis d'éliminer *Map*. Le traitement était à base de dihydrostreptomycine (500 mg, IM), de rifampicine (300 mg, VO) et d'isoniazide (300 mg, VO) (Slocombe, 1982).

- de même, l'administration quotidienne de sodium de monensin (450 mg/vache/jour) pendant 120 jours n'a permis qu'une réduction des lésions digestives observées en histologie, sans guérison ultérieure (Brumbaugh *et al.* 2000).

A la dose de 335 mg/vache/jour à l'aide d'un dispositif intraruminal de sodium de monensin, une baisse de 80% de l'excrétion fécale fut toutefois observée, bien que l'importance biologique et épidémiologique d'une telle réduction ne soit pas confirmée, ni l'existence de cette réduction chez les forts excréteurs (Hendrick, S.H. *et al.* 2006) .

Le traitement des infections par *Map* à base de molécules antimycobactériennes demeure donc impraticable chez les ruminants, car le coût est prohibitif et injustifié dans la plupart des circonstances, car l'efficacité est plus qu'aléatoire.

Les traitements envisagés nécessiteraient des administrations quotidiennes d'une association d'antibiotiques, qui d'ailleurs n'ont pas d'AMM vétérinaire pour l'utilisation chez les animaux de production.

D'autre part, les antibiotiques (isoniazide, ethambutol et pyrazinamide) utilisés pour le traitement de la tuberculose chez l'homme ont montré une efficacité et succès mitigés.

Des essais cliniques ont également montré l'efficacité de trois molécules (rifabutine, clarithromycin (macrolide), clofazimine) contre *Map*, *in vitro* et *in vivo* (ces molécules se concentrent dans les macrophages dans lesquels *Map* se multiplie) ; toutefois, leur efficacité dans un cadre thérapeutique reste là aussi incertaine.

De plus, il faut considérer l'implication possible de *Map* dans l'étiologie de la maladie de Crohn.

Des résultats cliniques ayant été obtenus dans le traitement de cette affection lors de l'administration de l'association rifabutine-clarithromycin-clofazimine (cf. I.1.1.1.3.), et étant donné l'émergence de plus en plus préoccupante de résistances en médecine humaine, il est essentiel d'interdire tout traitement de la paratuberculose des ruminants. La recherche de traitements comme alternatives à l'abattage précoce des animaux infectés est cependant envisageable.

Ce raisonnement est valable pour les molécules utilisées dans le cadre du traitement de la tuberculose humaine.

III.4.2.2.1.1.2. Traitement à base de mycophages

Au cours des 50 dernières années, différentes études ont rapporté des succès cliniques liés à l'utilisation de phages, allant de 80 à 95 % d'efficacité dans l'amélioration clinique d'affections humaines impliquant des germes tels que *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* et diverses salmonelles (Emery, D.L. *et al.* 2004).

Ces affections incluaient notamment des gastroentérites, des pneumonies, des ostéomyélites, ou bien encore des brûlures et des dermatites surinfectées.

Aucun effet secondaire majeur lié à l'utilisation des phages n'a été observé. Néanmoins, le risque d'un transfert de résistance aux antibiotiques demeure une question préoccupante, principalement lors de l'utilisation de phages isolés à partir de sources environnementales, pour lutter contre des bactéries pathogènes.

Les mycophages sont des bactériophages particuliers, qui infectent les mycobactéries.

Toutefois, plusieurs limites existent pour une utilisation dans le cadre de la paratuberculose :

- Les mycophages à action lytique montre une efficacité supérieure sur les souches de mycobactéries à croissance rapide, et pour la plupart non pathogènes. Toutefois certains mycophages (tels que TM4) sont capables d'infecter *Map* plus ou moins efficacement (activité plus limitée du phage ph60 sur *Map*).

- Un autre risque serait le transfert de matériel génétique à *Map*, notamment de gènes de résistance aux antibiotiques, ou des gènes de virulence.

- A ce jour, l'efficacité réelle des phages sur des bactéries intracellulaires, telles que les mycobactéries, n'est pas encore clairement établie. Toutefois, l'utilisation de phages contre des bactéries intracellulaires telles *Brucella*, *Chlamydia* et *Salmonella* semble rendre pertinente l'utilisation des mycophages pour l'infection à *Map*.

- Aucune donnée ne permet à ce jour de savoir si les phages candidats pour le traitement de l'infection à *Map* auront la capacité de se lier aux cellules de l'hôte, d'y pénétrer (les données concernant les autres pathogènes intracellulaires, notamment *Mycobacterium tuberculosis*, sont divergentes à ce sujet).

- Il reste également à déterminer si les phages pourront être utilisés pour lyser les cellules de *Map* directement dans l'environnement, pour prévenir la contamination des animaux sensibles.

A ce jour, les données concernant les possibilités thérapeutiques qui reposent sur l'utilisation de mycophages demeurent trop parcellaires, pour envisager leur utilisation dans un futur proche. Si cette utilisation était envisagée, des recherches portant sur les répercussions possibles chez les animaux destinés à la consommation humaine seraient en outre nécessaires. Il est fort à parier que cette possibilité demeure une impasse thérapeutique.

III.4.2.2.1.2. Traitement médical à visée préventive : utilisation de la vaccination

Selon les études disponibles, un plan de lutte contre la paratuberculose au sein d'un élevage dure en moyenne de 4 à 7 ans lorsque la vaccination est utilisée, alors qu'il est de 5 à 8 ans en son absence.

Le premier vaccin (vivant) à base de *Map* fut utilisé en 1926. A partir de cette date, différentes formulations furent utilisées:

- bactéries vivantes de souches atténuées ou non atténuées
- organismes tués par la chaleur
- fragments antigéniques de *Map*.

III.4.2.2.1.2.1. Objectifs de la vaccination

Dès le début de son utilisation, la vaccination concerna principalement les jeunes animaux (les animaux de 0 à 6 mois étant la classe d'âge qui risque le plus de contracter une infection, et l'action préventive de la vaccination apparaissant plus efficace dans les premières phases de la maladie); les protocoles utilisés étaient sensiblement identiques chez les bovins, les ovins et les caprins.

Par la suite, en plus de l'objectif préventif, il fut observé que la vaccination permettait **en partie** de réduire à la fois l'excrétion et l'incidence clinique, aussi bien chez des animaux infectés expérimentalement que naturellement.

En pratique, le but de la vaccination contre la paratuberculose est :

- de contrôler le cycle infectieux en réduisant le niveau de contamination des pâtures à travers le temps et donc une source essentielle de contamination
- d'augmenter la proportion d'animaux exposés à *Map* qui résisteront partiellement à l'infection, ou du moins n'excrèteront pas de bacilles tant qu'ils seront présents dans l'exploitation (ce dernier aspect est principalement vrai pour les petits ruminants).

Les données obtenues à ce jour, aussi bien avec les vaccins à germes vivants que ceux à germes tués, habituellement administrés par voie sous-cutanée, en dose unique, jusqu'à la limite de 4 mois d'âge, montrent que l'on obtient par la vaccination :

- une diminution de l'excrétion fécale (en contrôlant la multiplication bactérienne dans l'intestin),
- un ralentissement de la progression des lésions, mais également une réponse immunitaire plus efficace durant les premiers stades de l'infection (Begg, D.J. *et al.* 2005a).

Pour obtenir une protection vaccinale la plus efficace et la plus durable possible, il est nécessaire d'induire une protection immunitaire de type Th1 (réponse à médiation cellulaire). La vaccination néonatale avec une dose définie de *Map* offre alors les meilleures perspectives. Cependant, les nouveaux-nés ont des réponses principalement de type Th2. Pour moduler la polarisation de la réponse, et mettre en place une réponse immunitaire de type Th1, il est nécessaire d'utiliser une vaccination très précoce, avec de faibles doses de *Map*, et avec un adjuvant précis, qui reste encore à définir (Emery, D.L. *et al.* 2004).

Ce type de protocole permettrait de créer une « empreinte immunitaire » de type Th1 (de fortes doses immunogènes entraînent plutôt une réaction de type Th2, qui n'est pas protectrice (cf. II.3.2.1.) dans la cas de la paratuberculose).

De plus, cette vaccination doit intervenir très précocement afin que les mécanismes immunitaires soient efficaces avant que le risque infectieux apparaisse.

Des rappels de vaccination ont été envisagés chez les ovins et les bovins, mais cela ne semble pas capable d'augmenter la résistance des animaux à l'infection.

La vaccination des animaux adultes, infectés ou pas, est également sujet de controverses, car leur sensibilité à l'infection est moindre. Elle se justifierait lors de l'introduction dans des zones d'endémie, ou permettrait peut être de diminuer les niveaux d'excrétion, et donc le risque de contamination des jeunes. Cependant, les résultats et les conséquences de la vaccination semblent moins prédictibles chez eux.

III.4.2.2.1.2.2. Limites de la vaccination

Malgré ses intérêts, la vaccination ne permet en aucun cas d'éliminer complètement la maladie sous sa forme clinique. Elle permet de réduire l'excrétion, et n'a donc qu'un effet marginal sur la prévalence de l'infection au sein du troupeau, en particulier si d'autres mesures préventives dans la conduite d'élevage ne sont pas appliquées.

De ce fait, des progressions alarmantes du nombre de cas cliniques ont été constatées à l'arrêt des programmes de vaccination.

III.4.2.2.1.2.2.1. Liées à l'adjuvant

Une autre limite à l'utilisation de la vaccination, mineure par rapport aux conséquences de la paratuberculose elle-même, est la formation possible d'abcès au point d'injection (observé dans 10 % des cas et lié principalement à l'adjuvant).

Ces lésions au site d'injection sont visibles après 2 mois chez plus de 50 % des animaux, et persistent au minimum pendant 4 ans chez 20 à 25 % des animaux vaccinés (Reddacliff, L. *et al.* 2006).

L'adjuvant utilisé jusqu'à ce jour est composé d'huile minérale ; lequel est connu pour provoquer de fortes réactions inflammatoires locales,

La difficulté dans le choix de l'adjuvant, est liée au fait qu'il joue un rôle déterminant dans l'orientation de la réponse immunitaire ; le type d'adjuvant susceptible d'avoir ces effets provoque souvent des lésions au site d'injection.

L'effet d'un adjuvant huileux (utilisé notamment dans le vaccin NeoParasec®) a été comparé à celui d'un adjuvant aqueux.

L'adjuvant huileux permet la mise en place d'une immunité protectrice très supérieure ($P < 0,01$) à celle d'un adjuvant aqueux moins agressif (mise en place d'une réaction immunitaire type Th1 dans les 2 semaines après l'injection pour l'adjuvant huileux, avec un maximum observé après 6 semaines), sans être suffisamment précoce et efficace pour empêcher l'installation de l'infection.

Ainsi, lorsque la contamination a été réalisée deux mois après la vaccination, 28 % des animaux seulement présentèrent des lésions paratuberculeuses à 22 mois, contre 75 % chez ceux immunisés avec un adjuvant aqueux (80% dans le groupe contrôle, non vacciné) (Begg, D.J. *et al.* 2005a).

L'utilisation d'un adjuvant huileux minéral est donc préconisée.

Des études sont en cours pour obtenir des adjuvants lipidiques moins agressifs que les huiles minérales conventionnelles.

III.4.2.2.1.2.2.2. Liées au choix germes vivants vs inactivés

Bien que les résultats obtenus avec un vaccin utilisant un germe vivant atténué soient plus favorables que ceux obtenus avec des vaccins à germes tués (cf. infra), ces derniers seront préférés aux vaccins à germes vivants, à cause de plusieurs raisons :

- le risque d'auto-inoculation avec un germe vivant potentiellement dangereux pour l'homme,
- la durée de vie du vaccin à germe vivant plus courte et limitée à 14 jours,
- le risque d'un défaut d'atténuation de la souche vaccinale, ce vaccin étant utilisé chez des animaux destinés à la consommation humaine.

Les derniers vaccins paratuberculeux à germes vivants ont été utilisés en Nouvelle-Zélande jusqu'en 2002.

Les antigènes responsables de la réponse immunitaire protectrice n'ont toujours pas été clairement identifiés, les vaccins actuellement utilisés restent principalement des préparations à base de cellules entières.

Leur détermination pourrait, par exemple, entrevoir la possibilité de vaccins recombinants, ou de vaccins délétés tels que dans le cas de l'IBR.

Les vaccins à ADN (composés de plasmides codant pour des antigènes mycobactériens) sont actuellement en cours d'élaboration ; ils trouveraient une application dans le cadre de la prévention de la paratuberculose.

En effet, la nature des antigènes sélectionnés pour la composition des vaccins peut participer à l'orientation et au type de réponse immunitaire (Sechi, L.A. *et al.* 2006).

Par exemple, des études ont été menées sur l'utilisation *d'une* protéine Hsp (notamment Koets, A. *et al.* 2006). Cette famille de protéines existe aussi bien chez les organismes eucaryotes que procaryotes. L'expression des protéines Hsp est augmentée en cas d'inflammation.

De plus, dans le cas des maladies mycobactériennes comme la paratuberculose, la protéine Hsp intervient comme un antigène dit immunodominant, provoquant une forte réaction immunitaire, à la fois Th1 et Th2.

La protéine recombinante **MAP Hsp70** (70 kDa) induit une réponse immunitaire de type Th1 (et donc potentiellement une immunité protectrice vis-à-vis de l'infection).

Un vaccin sous-unitaire utilisant MAP Hsp70, et injecté 2 fois à 308 jours d'intervalle, a permis une réduction significative ($p < 0,01$) de l'excrétion fécale pendant les 2 ans qui ont suivi l'infection (Koets, A. *et al.* 2006). La durée de cette étude n'a toutefois pas permis d'évaluer l'effet de ce vaccin dans la réduction de la forme clinique.

De plus, la différenciation des infectés par rapport aux vaccinés est alors possible par sérologie ELISA indirecte.

III.4.2.2.1.2.2.3. Liées aux interférences avec d'autres tests immunologiques

Le dernier vaccin contre la paratuberculose (NeoParasec®) qui était utilisé en France ne possède plus d'AMM depuis octobre 2001 ; une des principales raisons de cette interdiction est l'existence d'interférences avec les tests immunologiques utilisés pour le diagnostic de la tuberculose à *Mycobacterium bovis*.

Ces interférences sont consécutives à un haut niveau de réactivité antigénique croisée entre les souches vaccinales de *Map*, et *Mycobacterium bovis*. Cets réactions croisées existent aussi avec les isolats de *Map*.

La vaccination interfère également avec le diagnostic de la paratuberculose elle-même.

Du fait de la forte diminution d'excrétion de bacilles induite par la vaccination, les tests de culture fécale sont plus souvent négatifs chez les animaux qui expriment néanmoins la maladie cliniquement (par exemple un amaigrissement chronique).

De plus, les tests de sérologie ELISA pratiqués sur des individus vaccinés sont fréquemment positifs, est ce d'autant plus que l'animal est testé jeune.

L'impact de la vaccination avec le vaccin Neo Parasec® sur le résultat de la sérologie ELISA a été étudié en France (Joly, A. *et al.* 2002).

Comme nous l'avons vu, certains animaux, bien que vaccinés, sont ou deviennent excréteurs. Ce sont ces animaux qui rendent les plans de lutte inefficaces à l'arrêt de la vaccination.

Dans l'idée d'un usage à court/moyen terme de la vaccination, il est donc indispensable de pouvoir différencier les animaux vaccinés et les animaux naturellement infectés.

Ainsi, dans l'hypothèse où la vaccination serait à nouveau utilisée en même temps que la certification, avec un vaccin dont les propriétés seraient proches du vaccin Neo Parasec®, les troupeaux vaccinés ne devraient en aucun cas être considérés comme indemnes de paratuberculose.

Au contraire, ils doivent être considérés comme infectés (rappelons que la vaccination ne semble pas réduire significativement la prévalence totale dans un cheptel).

Lors de l'étude de Joly, A. *et al.*, certains animaux étaient séropositifs (majoritairement de jeunes animaux) par le fait uniquement, de la vaccination.

Toutefois, au minimum 70% des bovins vaccinés ne réagissent pas en sérologie, et ce quel que soit l'âge auquel elle est réalisée, et quel que soit l'âge de la vaccination si elle est réalisée dans le premier mois de vie (Joly, A. *et al.* 2002).

III.4.2.2.1.2.3. Conséquences de l'utilisation de la vaccination dans les autres pays

Lors de son utilisation en France, dans un cadre réglementaire très strict, la vaccination était réalisée sur les animaux âgés de moins de un mois.

Toutefois, il était recommandé, en élevage bovin, de réaliser l'injection vaccinale unique le plus tôt possible après la naissance du veau (24 à 48 heures), au pire dans la première semaine de vie.

Le débat sur l'utilisation du vaccin repose également sur la différence possible d'efficacité entre les vaccins à germes vivants et les vaccins à germes inactivés (en plus des risques évoqués ci-dessus (cf. III.4.2.2.1.2.2.2.))

Par exemple, une étude fut menée sur le sujet en France à l'aide du vaccin vivant atténué Neo Parasec® (Argent, 1991).

En sus des mesures préventives usuelles (élimination des excréteurs et de leur descendance, utilisation de l'eau du réseau, hygiène au vêlage, ...), la vaccination a permis une réduction plus élevée du niveau d'excrétion fécale (85% ; n=2073 bovins suivis), contre 23 % (n=1281 bovins suivis) sans utilisation de la vaccination (Argent, 1991).

En comparaison, le niveau d'excrétion fécale n'a diminué que de 50% avec un vaccin inactivé (Larsen *et al.* 1978).

En **Australie** (utilisation du vaccin inactivé Gudair®, importé dans ce pays par Pfizer Santé Animal, et autorisé depuis 2002), l'efficacité de la vaccination sur des cheptels ovins a été évaluée sur une période de 5 ans (Reddacliff, L. *et al.* 2006), dans des **conditions de plein air intégral**, où les mesures hygiéniques sont donc difficiles à mettre en place.

La mortalité due à la paratuberculose a été diminuée de 90%.

Parmi la population des animaux vaccinés, il n'y a eu aucune excrétion détectée jusqu'à 18 mois après la vaccination (soit chez des animaux âgés de 21 mois environ), alors que l'excrétion était détectée dès 9-11 mois chez ceux qui n'étaient pas vaccinés.

La vaccination a ainsi permis, dans ces modalités particulières d'élevage, non seulement de retarder l'excrétion fécale ($P < 0,01$), mais également de réduire le niveau d'excrétion ($P < 0,01$), avec un maintien de la protection pendant toute la durée de vie économique des ovins.

La prévalence des animaux excréteurs au sein de la population vaccinée a ainsi baissée de 90%, et fut maintenue à ce niveau jusqu'à la fin de l'essai (entre 2 et 26% de baisse observée pour les animaux non vaccinés, en fonction des fermes).

La diminution du nombre d'animaux infectés a été dans ces conditions de 76 % ($P < 0,01$), les infections sub-cliniques diminuant de 66% ($P < 0,01$)

La contamination des pâtures fut également réduite de plus de 90%.

Toutefois, il existe de grosses disparités entre les fermes. De plus, 7 ovins parmi les 600 qui avaient été vaccinés présentèrent une excrétion forte, sachant qu'un animal fortement excréteur peut suffire à infecter toute une cohorte d'animaux sensibles dans certaines conditions.

Cela souligne, cette fois encore, le risque déjà évoqué précédemment que des animaux vaccinés puissent tout de même transmettre la maladie. En présence de la vaccination, une attention particulière devra être portée aux déplacements d'animaux vaccinés vers des zones de plus faible prévalence (par une vérification de l'absence d'excrétion par exemple).

De plus, nous pouvons mentionner qu'aucun paramètre relatif à la reproduction n'a été mesuré au cours de cette étude, de même que les répercussions possibles de l'arrêt du protocole vaccinal (Reddacliff, L. *et al.* 2006).

Cette étude ayant été menée sur une seule cohorte, d'autres études sont en cours pour estimer les conséquences de la vaccination au cours des générations successives, en prenant en compte la prévalence initiale.

En dépit du succès apparent de la vaccination en Australie, l'ensemble des auteurs sont d'accord sur le fait, comme dans le cas de la tuberculose bovine, que l'élimination totale de la paratuberculose n'est pas réalisable actuellement par l'utilisation de la vaccination ; l'application de mesures préventives strictes dans la conduite d'élevage est essentielle.

L'exemple de l'Islande est démonstratif des risques encourus lors de l'utilisation de la vaccination : après l'échec des mesures de prévention habituelles, la vaccination a été autorisée dans les cheptels ovins (entraînant conjointement un relâchement dans l'application des mesures préventives). Après une baisse de 94 % de la mortalité due à la paratuberculose, et une longue période de vaccination obligatoire, la paratuberculose est à nouveau une pathologie majeure dans les cheptels ovins.

Ainsi, au regard des expériences internationales et française, il paraît indispensable à ce jour de réaliser un état des lieux complet de la situation de la paratuberculose en France avant d'entreprendre une nouvelle utilisation du vaccin contre la paratuberculose, en plus des études de risque, économiques et des contraintes administratives et commerciales que cela entraînerait.

Contrairement aux pratiques utilisées en France avant 2001, la vaccination ne doit en aucun cas être interprétée comme l'outil majeur de la lutte contre la paratuberculose. Il est essentiel de mettre en place des mesures préventives solides dans la conduite d'élevage avant d'envisager d'autres approches.

Après cette étape indispensable à la maîtrise, l'intérêt économique et sanitaire d'une vaccination paratuberculeuse pourra être évalué dans une partie des cheptels seulement, au sein de certains élevages touchés par *Map*.

Les critères à retenir dans le choix de l'utilisation de la vaccination dans un élevage sont les suivants :

- taux d'atteinte clinique et prévalence élevés en début du plan d'assainissement, l'intérêt de la vaccination augmentant parallèlement à ces taux,
- existence de contacts étroits et prolongés entre la mère et le veau, ce qui est le cas en élevage allaitant (les mesures préventives pourraient être suffisantes en élevage laitier),
- difficultés d'application de l'ensemble des mesures sanitaires préventives (élevage de plein air intégral par exemple).

Ainsi, la vaccination contre la paratuberculose peut-être considérée comme utile dans certains élevages bovins allaitants fortement touchés, ou dans le cadre des cheptels de petits ruminants où la prévalence de la pathologie est forte ; en effet dans les espèces caprines et ovines, les éléments cliniques souvent frustrés, et le poids économique de la répétition de tests très élevé en comparaison de la valeur individuelle des animaux, ne permettent pas une détection et une élimination précoces des animaux excréteurs.

Les tests de dépistage ne sont pas, pour la plupart, validés pour ces espèces, et les tests d' IDT sont pas effectués pour ces espèces (donc pas d'interférence possible à ce niveau).

Enfin, il faut nécessairement prendre en compte le fait que les protocoles de vaccination sont lourds et coûteux, et pourront donc être que temporaires.

La vaccination est habituellement arrêtée lorsque 80% des animaux présents ont été vaccinés en début de vie, et que les 20% restants, plus âgés, ont aux moins deux coprocultures négatives consécutives.

L'absence d'éradication de l'infection à ce stade permet le plus souvent la contamination des jeunes, ce qui permet ultérieurement la reprise de la dynamique d'infection au sein de l'élevage.

Tableau 13 : Comparaison de différents vaccins contre la paratuberculose

(Thorel, M.F. et Delcroix, T. 2002)

	Gudair®	Weybridge®	Mycopar®	Néo Parasec®¹
Laboratoire producteur (pays)	CZ Veterinaria SA (Espagne)	Weybridge VLA (Royaume-Uni)	Solvay Animal Health (Etats-Unis)	Merial SA (France)
Nature du vaccin	Inactivé par la chaleur	Vivant atténué	Inactivé	Vivant atténué
Souches utilisées	<i>Map</i> 316F	3 souches : 316F, 2e, II	Souche St18, <i>Mycobacterium avium subsp.avium</i>	316F
Charge antigénique du vaccin	Chaque dose contient 2,5 mg de bacilles déshydratés			3x10 ⁹ unités viables / ml
Nature de l'adjuvant	Huile minérale	Paraffine liquide et pierre ponce	Huile minérale	Huile minérale
Espèces concernées	Ovins, caprins	Bovins, ovins, cervidés, caprins	Bovins	Bovins, ovins, caprins
Schéma posologique	1 ml Injection sous-cutanée	Bovins : 1,5 ml Ovins, caprins et ervidés 0,75 ml	Bovins : 0,5 ml	Bovins : 2 ml Ovins : 1 ml Injection sous-cutanée
Coût de la dose	1 euro	17 euros pour 1,5 ml (8,5 pou 0,75 ml)	5,5 euros	
Date de début d'utilisation du vaccin dans le pays	1994	Avant 1970	Expérimentalement en 1968 et 1972 vaccin agéé	Avant 1970

¹ : La fabrication de Néo Parasec® est arrêtée depuis octobre 2001.

III.4.2.3. Lutte contre la paratuberculose dans des élevages où la prévalence est faible

Dans les cheptels infectés avec un faible taux de prévalence, bien que les mesures de dépistage/élimination des animaux excréteurs soient les mêmes, la lutte repose encore plus sur les mesures sanitaires pour prévenir de nouvelles infections.

Concernant le taux de prévalence observé, il faut souligner toutefois (voir notamment Collins, M.T. *et al.* 2005) qu'étant donné les caractéristiques des tests sérologiques ELISA, qui sont utilisés dans la majorité des dépistages, seulement un tiers des animaux infectés et possiblement excréteurs est détecté (sensibilité des tests ELISA : cf. Figure 14) : **le pourcentage d'animaux testés positifs pourrait être au minimum multiplié par trois pour donner une estimation réelle de la prévalence de l'infection au sein d'un troupeau.**

L'ensemble des mesures préventives proposées repose sur le pré-requis que *Map* est un agent pathogène parasite obligatoire des animaux, et qui donc ne se multiplie pas dans le milieu extérieur. Cependant, il ne faut pas omettre que ce bacille peut survivre pendant des durées extrêmement longues en dehors de l'hôte.

III.4.2.3.1. Mesures communes

III.4.2.3.1.1. Isolement des animaux suspects

Tout animal qui présente une diarrhée chronique, une phase d'amaigrissement, voire, chez les races laitières, une baisse importante de la production laitière alors qu'aucune autre cause ne puisse être mise en évidence, doit être isolé dans un local d'infirmierie, absolument distinct du local de mise bas, isolé des animaux de moins de 1 an, et permettant de traiter les effluents à part.

III.4.2.3.1.2. Gestion des animaux excréteurs

Tout animal détecté comme excréteur doit être isolé immédiatement, qu'il soit ou non en phase clinique, et ses déjections traitées séparément (mesures identiques à celles appliquées aux animaux suspects).

Si la proportion des animaux excréteurs est trop grande, la constitution d'un lot séparé doit être envisagée. Ce lot devra alors être mené de manière indépendante (en terme de gestion du pâturage, de traitement des effluents, de logement, en évitant tout contact avec les animaux de moins de 1 an).

La réforme de ces animaux doit se faire, dans la mesure du possible, dans les quatre mois qui suivent leur identification.

Concernant la gestion de la descendance des vaches excrétrices, il est vivement conseillé de les écarter de la reproduction :

- les deux dernières femelles issues de vaches qui ont une paratuberculose clinique (*la transmission transplacentaire est constatée chez 40 à 50 % des vaches en phase clinique*),
- la dernière femelle issue de vaches excrétrices asymptomatiques (*transmission transplacentaire chez 8 à 10 % des femelles au stade sub-clinique*).

Ces produits doivent être écartés de manière systématique de la reproduction. Si à cause d'une grande valeur génétique, l'animal est maintenu dans le troupeau, il est nécessaire de contrôler par une sérologie et coproculture l'absence d'excrétion tous les 6 mois de 18 à 48 mois au minimum.

Par analogie, les animaux nés dans les 12 mois qui précèdent la mise en place du plan d'éradication, et dans les 6 mois qui suivent, doivent être considérés comme infectés et réformés dès que possible.

Si l'infection est détectée sur un animal né après la mise en place du suivi, et qui n'est pas issu d'une vache reconnue excrétrice, cela devra être considéré comme un échec des mesures de lutte, et doit provoquer la recherche des erreurs d'élevage.

En raison du coût des réformes, (critère particulièrement pertinent dans les élevages à forte prévalence d'infection), la priorité en début de plan doit être donnée à la recherche et à l'élimination des animaux **excréteurs vrais** pour abaisser la pression d'infection. Pour leur identification, il est possible d'utiliser la coproculture ou, si cette méthode est validée en pratique, par la méthode des tests ELISA combinés (cf. III.4.2.1.1.).

L'aspect économique peut également justifier l'utilisation de la sérologie ELISA en test unique cette fois, lors de dépistages dans les élevages à faible prévalence d'infection ; en effet, quand le taux d'infection est faible, la valeur prédictive positive de l'ELISA se dégrade, entraînant des réformes injustifiées qui ont un coût élevé pour l'éleveur.

III.4.2.3.1.3. Gestion et traitement des effluents

Les déjections des animaux mis en isolement (y compris lors de suspicion) ne doivent pas être épandues sur les pâtures, mais uniquement sur les parcelles labourées ou pour les cultures destinées à la fauche.

Il convient de veiller à ce que les eaux de ruissellement depuis les zones de stockage des effluents du troupeau ne s'écoulent pas vers les zones de vie, d'abreuvement et d'alimentation des animaux, en particulier celles où séjournent les jeunes de moins de 1 an.

Le plan d'épandage doit prendre en compte le fait de ne pas épandre des lisiers ou des fumiers sur les parcelles accueillant les bovins de moins de 1 an.

De plus, les différents procédés de traitement des effluents bovins (cf. I.2.4.3.) ont une influence sur la persistance de *Map* dans les matières organiques.

Ainsi, le compostage ou le fumier accumulé doivent être favorisés par rapport à l'utilisation d'une fosse à lisier.

Au cours de l'étude rapportée en I.2.4.3., de l'ADN de *Map* a été détectable lorsque les deux premiers procédés de stockage ont été utilisés, jusqu'à plus de 56 jours, et pendant plus de 175 jours pour le stockage dans une fosse à lisier.

Il est classiquement admis que le stockage sous forme de fumier accumulé pendant au moins six mois permet, entre autres grâce à l'élévation de la température intérieure liée au processus de fermentation, la stérilisation partielle de la matière organique.

III.4.2.3.1.4. Hygiène des bâtiments

Le nettoyage des stalles en stabulation entravée, de même que les aires d'exercice en stabulation libre, doit être quotidien.

Les aires paillées doivent recevoir une quantité suffisante de paille, de l'ordre de 1kg/m²/jour

L'utilisation de superphosphate de chaux, à raison de 1kg/10 m² une fois par semaine, s'avère également utile, car il permet de diminuer l'humidité de la litière.

Bien évidemment, une attention particulière devra être portée aux zones qui ont accueilli des animaux excréteurs (ou simplement suspects). Une fois la litière évacuée, ces aires doivent être débarrassées, sur toute la surface ainsi que sur une hauteur d'un mètre, de toute la matière organique, nettoyées à l'aide d'un jet haute pression (eau chaude de préférence), puis désinfecté à l'aide d'un désinfectant adapté (cf. I.2.5.1.).

Ces mesures d'hygiène du logement sont très importantes pour les jeunes animaux fortement sensibles, mais également pour les adultes (par exemple, rappelons que la glande mammaire d'une vache peut potentiellement être infectée par voie ascendante (cf. I.2.3.4.4.), à la suite d'une contamination extérieure. Les souillures augmentent alors l'exposition du veau, alors que la mère n'est pas excrétrice).

Il est également nécessaire de maintenir le local (ou le box) et le matériel de vêlage propres, et ils doivent être régulièrement désinfectés. La litière doit rester propre et recouvrir toute la surface du local. En aucun cas, le local ne doit servir d'infirmierie.

III.4.2.3.1.5. Conduite au pâturage

Les animaux infectés/excréteurs doivent être regroupés dans un même lieu, et conduits séparément jusqu'à la réforme. Les pâturages qui ont accueillis ces bovins ne doivent pas accueillir avant une année (au minimum) les jeunes de moins de 1 an.

Par extension, il est conseillé de ne pas faire pâturer les animaux de moins de 1 an avec des animaux plus âgés (voire, de ne pas faire pâturer les animaux de moins de 6 mois pour limiter au maximum le risque de contamination par l'environnement : cette mesure est notamment recommandée dans les plans de lutte allemands).

La gestion après déstockage des pâtures est très importante (Whittington, R.J. *et al.* 2004) : un pâturage sélectif par des espèces non réceptives (chevaux, porcins...), ou le fauchage, peuvent être utilisés pour limiter les surfaces ombragées et accélérer ainsi la décontamination des surfaces herbagées.

La persistance de *Map* dans le sol, à cause très probablement d'un phénomène de dormance, peut être supérieure à 1 an dans certaines conditions (sans qu'aucune limite maximale n'ait été clairement établie à ce jour), et supérieure à 24 semaines sur les parties aériennes des plantes ; la persistance mesurée à l'intérieur des matières fécales sur le pâturage variant de 98 jours à plus de 55 semaines.

Le traitement des sols, à raison d'une tonne de chaux pure par hectare (amendement calcique), dans le but de favoriser une augmentation de pH, peut être envisagé dans les régions où le sol est acide. En effet, bien qu'aucun lien significatif n'ait pour le moment été mis en évidence (cf. I.2.4.1.1.) entre la durée de persistance de *Map* et des facteurs tels que l'humidité, le pH et le type de sol, les sols humides, acides, décalcifiés, déphosphorés ou à faible teneur en potasse sont pourtant encore considérés comme des facteurs de risque pour la paratuberculose.

Néanmoins, le chaulage diminue fortement la biodisponibilité des oligo-éléments ; dans ce cas, il est judicieux de veiller à ce que les besoins alimentaires soient couverts grâce à une complémentation.

Les zones marécageuses, humides, propices à la survie de *Map*, et qui sont donc favorables à l'entretien du bacille, devront être délimitées pour éviter la présence des animaux (mesure également profitable dans la lutte contre d'autres pathogènes, tels que le parasite *Fasciola hepatica*).

De plus, la paratuberculose clinique peut être présente chez les ruminants sauvages, et également de manière significative chez certains monogastriques tels que le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) et le lièvre (*Lepus europaeus*).

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'existence et le rôle épidémiologique potentiel de foyers sauvages ne sont pas encore complètement élucidés (cf. I.1.1.1.2.4.3.), aussi bien pour le maintien de l'infection en certaines zones, que pour la contamination de cheptels non-infectés.

Dans les zones où l'élevage est dense, et où des foyers de paratuberculose sont présents, il convient donc, dans la mesure du possible, de limiter les contacts avec la faune sauvage, bien que cette mesure soit le plus souvent illusoire.

III.4.2.3.1.6. Séparation des espèces sensibles

Tout contact entre espèces sensibles (donc principalement les ovins et les caprins) doit être proscrit, que ce contact soit direct ou indirect (via l'eau, l'alimentation ou les déjections).

De même, le mélange de bovins d'origines différentes et non contrôlées doit être proscrit (par contact direct ou indirect).

III.4.2.3.1.7. Abreuvement

L'eau de boisson, qui peut être contaminante, doit avoir une origine sans équivoque, en particulier pour les jeunes animaux. L'utilisation de l'eau du réseau reste la meilleure garantie, si l'on prend bien évidemment soin de maintenir les réceptacles (abreuvoirs, tonnes à eau) exempts de souillures fécales.

Dans les mares et les rivières à faible débit, les bacilles se trouvent principalement dans la phase limon/sédiments (cf. I.2.4.2.), avec une persistance supérieure à 12 mois (une persistance de 18 mois est décrite dans l'eau d'un bassin artificiellement contaminée, ainsi qu'une durée extrême de 841 jours dans le microcosme de l'eau d'un lac).

Rappelons en effet que les persistances les plus longues furent mises en évidence en milieu liquide, où l'amplitude des variations thermiques est plus limitée.

Ainsi, afin d'éviter le piétinement des animaux qui provoque la mise en suspension des sédiments, et des pathogènes qu'ils contiennent, il est conseillé de clôturer les points d'eau, et de mettre de l'eau à disposition dans des abreuvoirs.

Cette mesure est particulièrement pertinente si d'autres animaux sont présents en amont du point d'accès (dans les zones d'élevage notamment), ou si des troupeaux infectés ont fréquenté l'endroit dans les 12 derniers mois.

III.4.2.3.1.8. Equilibre alimentaire et parasitisme

Une bonne gestion des apports alimentaires de l'ensemble des catégories d'animaux et un contrôle parasitaire adéquat, notamment vis-à-vis de la fasciolose et de la paramphistomose (cf. I.2.4.4.1.), sont autant de facteurs qui influencent positivement l'évolution de la maladie chez les bovins contaminés ; ils permettent de diminuer l'expression clinique de la maladie.

III.4.2.3.1.9. Reproduction

Rappelons (cf. I.2.3.2.1.) qu'à plusieurs reprises des cellules de *Map* ont été détectées dans le sperme, de même que dans le tissu testiculaire, en présence ou non d'excrétion fécale.

Bien que la majorité des auteurs pensent que la dose infectieuse (de même que la voie de contamination) est insuffisante pour infecter la femelle saillie ou inséminée, le risque de transmission par voie sexuelle existe.

Il est donc conseillé :

- d'éliminer au plus tôt un taureau séropositif ou excréteur (et si sa réforme ne peut-être immédiate, le réserver au mieux aux vaches âgées (très peu sensibles), ou positives.
- ne pas mettre de taureau « supposé sain » sur des vaches connues excrétrices, ou séropositives.

Concernant la transplantation embryonnaire (cf. I.2.3.2.2.3.), aucun cas de transmission de la paratuberculose n'a été rapporté jusqu'à présent, que ce soit chez les receveuses ou les veaux nés à partir d'embryons.

Il semble très peu probable que *Map* puisse être transmis par le biais de la transplantation embryonnaire, à condition que les embryons soient nettoyés selon les recommandations de la Société Internationale du Transfert d'Embryon.

Dans la mesure du possible, les fermes fortement infectées ne doivent pas pratiquer l'auto-renouvellement (ou du moins le minimiser), mais réaliser des achats dans des troupeaux supposés sains (intérêt de l'existence d'une certification), d'animaux âgés de plus de 12 mois.

III.4.2.3.2. Particularités applicables à l'élevage allaitant

Les particularités des mesures, selon que le l'atelier de production infecté est de type allaitant ou laitier, concernent principalement la conduite de l'élevage des veaux.

En élevage allaitant, la marge de manœuvre concernant la conduite des veaux est étroite par rapport à l'élevage laitier. Il est impossible de séparer complètement les couples mère-veau. Il convient donc de veiller à une bonne hygiène quotidienne des locaux d'élevage

L'élevage de type allaitant est ainsi considéré comme un facteur de risque majeur de la paratuberculose (cf. I.2.3.3.)

Les mesures préventives devront être appliquées de manière d'autant plus stricte que les génisses (ou taurillons) sont destinés au renouvellement. Bien que ces mesures soient moins essentielles sur les veaux destinés à être abattus vers l'âge de 8-10 mois, il est recommandé d'appliquer les mesures préconisées à l'ensemble des veaux.

Dans de nombreux élevages allaitants, les veaux étant laissés en stabulation libre dans un box avec leur mère (qui doit impérativement être différent du local/box de vêlage) durant la première semaine de vie, il convient de maintenir une hygiène parfaite de ces locaux, grâce à un paillage quotidien et abondant (à hauteur de 1 kg/m²).

Pour limiter la contamination fécale de l'environnement des veaux, l'attache (à une distance suffisante des mères) ou la séparation dans une case à part sont conseillés. L'attache à l'arrière des mères est impérativement à proscrire (contamination fécale trop importante).

En dehors du moment de la tétée, il est possible de mettre les veaux en case collective (avec respect des classes d'âge), afin de limiter le contact avec les animaux adultes possiblement excréteurs.

Afin de minimiser le risque de transmission de la paratuberculose par contamination fécale lors de la tétée, il est indiqué de nettoyer les trayons souillés avant le passage des jeunes (voire de tirer les premiers jets de colostrum ou de lait, dont la teneur en germes est plus grande).

Il faut éviter que les veaux têtent plusieurs mères (cette pratique augmentant le risque que des veaux se contaminent par du lait contenant des mycobactéries).

Map est excrété à la fois dans le lait et dans le colostrum (selon les estimations, chez 35% des vaches avec une paratuberculose clinique et chez 3 à 10% des vaches infectées asymptomatiques).

Les veaux ne doivent consommer que le colostrum ou le lait de leur mère. Il ne faut pas mélanger le colostrum ou le lait de plusieurs vaches.

Si une mère est excrétrice (transmission pseudo-verticale via le lait/colostrum), dans la mesure du possible, il est indiqué de faire téter le veau à une mère négative, ou dans le meilleur des cas (si le souhait est de conserver cet animal pour le renouvellement), de lui faire boire un colostrum de synthèse, puis du lait artificiel.

De même, si une vache de race laitière est présente dans l'exploitation en complément de l'alimentation par les mères, son statut devra être connu et attentivement contrôlé (sérologie annuelle couplée à une coproculture tous les 6 à 12 mois).

III.4.2.3.3. Particularités applicables à l'élevage laitier

D'après une étude de Collins et Morgan réalisée en élevage laitier, si la paratuberculose entraîne une diminution de la production laitière de 6% au moins, il devient rentable de mettre en place un dépistage annuel avec une prophylaxie sanitaire, à condition

que la prévalence avant la réalisation des tests soit supérieure à 6%, à l'aide d'un test dont la spécificité est au moins de 98% et la sensibilité supérieure à 50 % (Collins. M.T. *et al.* 1991).

Par rapport à l'élevage allaitant, la séparation des couples mère-veau, ainsi que la séparation des différentes classes d'âge, est plus facile à réaliser ; c'est un facteur important dont il doit être tenu compte.

Dans un élevage laitier infecté par la paratuberculose, les veaux devront être séparés des mères immédiatement après la naissance. Ils seront alors nourris à l'aide d'un colostrum de synthèse, puis avec du lait artificiel.

Bien que cette mesure soit communément appliquée, il convient de ne pas utiliser le lait de mélange non commercialisé (excédents de production, lait contenant des résidus...) pour l'alimentation des veaux : cette pratique est d'ailleurs préjudiciable sur de nombreux aspects (composition variable du lait, présence d'antibiotiques à faibles doses favorable à l'apparition de résistance bactérienne, ...). On peut, le cas échéant, réserver le lait artificiel aux génisses de renouvellement.

Il est envisageable de pasteuriser le colostrum ou le lait à la ferme, bien que *Map* ait déjà été détecté dans le lait pasteurisé du commerce (cf. I.2.5.2.1.).

La stérilisation peut se faire par un procédé de forte pression hydrostatique à température ambiante (idéale, pourrait se réaliser sur du lait de tank réfrigéré en conservant ses qualités nutritionnelles et organoleptiques, voire sur du colostrum en préservant le transfert immunitaire) ou par la pasteurisation (également applicable au colostrum, cf.I.2.5.2.1.2.3.).

La zone accueillant les veaux de moins de 1an, durant la période de plus forte sensibilité vis-à-vis *Map*, devra être totalement séparée des zones abritant les adultes (au mieux il s'agira d'un bâtiment séparé), pour éviter les contaminations croisées.

Dans le même sens, le matériel d'élevage, les vêtements et les bottes de l'éleveur devront être spécifiques et réservés à ces locaux.

Une attention particulière devra être portée sur la préparation et la distribution des repas : il convient de les préparer dans de bonnes conditions hygiéniques, et toujours en dehors du bâtiment qui abrite les adultes.

III.4.2.3.4. Gestion des mouvements d'animaux

Pour prévenir l'émergence de nouveaux foyers de paratuberculose, des mesures de biosécurité, selon le mode du volontariat ou de façon obligatoire, seront appliquées afin de prévenir les mouvements d'animaux depuis les cheptels infectés (ou de statut inconnu) vers les cheptels indemnes, ou sans positivité connue.

III.4.2.3.4.1. Précautions lors de l'introduction d'animaux

Rappelons ici qu'il est **impossible** de **certifier** l'absence d'infection par *Map* chez un animal lorsqu'il provient d'un troupeau infecté, ou dont le statut n'est pas connu.

De ce fait, la qualification d'un animal doit être basée sur le statut sanitaire du cheptel d'origine ou de celui où l'animal est né.

D'autre part, l'absence d'infection au sein d'un troupeau doit être évaluée sur la base de plusieurs tests annuels ou pluri-annuels, tous négatifs, sur la totalité des animaux adultes du troupeau. En outre, ce troupeau doit être fermé ou respecter un certain nombre de règles à pour prévenir l'introduction de *Map*.

Ces quelques règles sont rappelés dans le *Voluntary Bovine Johne's Disease Control Programm* (Royaume-Uni).

A cause des contraintes liées à la quarantaine, et même si la culture fécale est la méthode probablement la plus sensible, elle n'est pas applicable pour vérifier le statut d'un animal avant l'introduction dans un troupeau, un résultat négatif définitif étant obtenu au bout de 16 semaines au maximum.

Lors de l'achat d'un reproducteur, d'un animal âgé de plus de 1 an, il est nécessaire de contrôler l'animal à son arrivée dans le nouveau cheptel ; le stress provoqué par le transport, et le changement des conditions d'élevage peut suffire à provoquer l'excrétion, chez un animal adulte qui n'avait pas excrété de bacilles jusque là.

Les méthodes que nous préconiserons sont le dépistage direct de l'excrétion par PCR (méthode dont la sensibilité et la spécificité sont proches de celles de la coproculture, mais dont le délai d'obtention des résultats est compatible avec les contraintes d'une introduction)

Son coût étant cependant supérieur, cette détection peut n'être envisagée que dans des élevages où la sécurité de l'achat doit être maximale (cas des élevages sélectionneurs par exemple).

Alternativement le dépistage sérologique, bien que moins sensible (sensibilité inférieure à 30 % chez les asymptomatiques, en fonction des tests (cf. II.3.4.1.2.)), peut également être utilisé.

Dans la possibilité où la méthode sérologique combinatoire (cf. III.4.2.1.1.) serait mieux validée, celle-ci pourrait avantageusement remplacer la sérologie simple, sans atteindre le coût financier d'une PCR.

Dans tous les cas, l'introduction de taureaux ou de génisses de moins de deux ans doit être réalisée en prenant les garanties citées plus haut.

Si un schéma de certification se mettait en place en France, les achats d'animaux ne devraient se réaliser que dans des élevages à niveau de sécurité équivalent ou supérieur.

Par exemple, dans le schéma de certification allemand, pour rendre ces mesures obligatoires, si un animal issu d'un cheptel de classification inférieure reste moins de 7 jours dans un élevage, il n'y a pas de sanction ; au delà, l'exploitation qui reçoit adopte le même niveau de certification que l'élevage d'origine, quel que soit son niveau au moment de l'achat.

Néanmoins, pour appliquer ces mesures, le nombre d'élevages certifiés doit être suffisamment grand pour satisfaire le marché des bovins de renouvellement.

III.4.2.3.4.2. Vente d'animaux

Bien évidemment, il faut impérativement éviter toutes les mesures qui deviendraient trop contraignantes lors de la vente de bovins pour les cheptels qui s'inscriraient dans un plan de lutte ; en effet, cette mesure aurait pour conséquence une sous-déclaration des foyers de paratuberculose clinique.

Néanmoins, rappelons que la vente de reproducteurs est la principale cause d'infection entre élevages pour la paratuberculose ; il paraît donc impératif de déconseiller à l'éleveur la vente des animaux suivants pour l'élevage :

- Les bovins nés dans les 12 mois avant et après l'épisode clinique
- les bovins dont la culture est positive, ou séropositifs
- le dernier veau né d'une vache que l'on sait infectée, grâce à l'un des tests (voire les 2 derniers veaux lors de paratuberculose clinique).

Dans cette optique, la signature d'un plan de maîtrise entre l'éleveur et le Groupement de Défense Sanitaire (notamment dans le cadre du programme national pour la maîtrise de la paratuberculose en élevage bovin cliniquement infecté), dans lequel de telles restrictions de vente sont incluses, constitue un point favorable.

CONCLUSION

La paratuberculose des ruminants, est présente sur l'ensemble des continents, et constitue une pathologie chronique, difficile à dépister et à contrôler ; ceci est notamment lié aux caractéristiques épidémiologiques de l'agent pathogène responsable, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*.

Considéré comme un agent pathogène parasite obligatoire des vertébrés supérieurs, *Map* possède cependant une très grande capacité à persister dans l'environnement (supérieure à un an dans certaines conditions), tant dans les matières organiques, que dans le sol et dans l'eau.

Sa persistance est la conséquence d'une résistance marquée, vis à vis des facteurs physiques comme la température, mais également de certains agents chimiques.

Les infections par *Map*, connues chez pratiquement toutes les espèces de ruminants, qu'elles soient sauvages ou domestiques, ont maintenant été identifiées chez des espèces animales monogastriques, comme les lagomorphes ; ces espèces pourraient donc jouer un rôle dans le maintien et la propagation de la paratuberculose parmi les troupeaux de ruminants domestiques, que ce soit les bovins ou les petits ruminants.

L'identification des espèces sensibles, ainsi que l'évaluation de leur rôle épidémiologique, a un intérêt certain concernant la lutte contre paratuberculose.

En outre, l'agent de la paratuberculose est peut-être impliqué dans la maladie de Crohn, inflammation digestive chronique chez l'homme. Alors que les données disponibles ne sont pas suffisantes pour le prouver, ou bien le sujet de nombreuses controverses, cette possibilité renforce d'autant plus la nécessité du contrôle de la paratuberculose chez les ruminants. De ce fait, la paratuberculose pourrait avoir un enjeu économique et sanitaire majeur dans les prochaines années.

La connaissance, dans le but de maîtriser cette maladie, de l'épidémiologie analytique (en terme de nature des sources de contamination, de réceptivité des espèces sensibles, et du mode et des voies de contamination) doit ainsi être la plus précise possible.

La maîtrise sanitaire permettra, en partie, de compenser le manque de sensibilité, et de spécificité des méthodes de détection actuellement disponibles.

Parmi les techniques utilisées pour le diagnostic ou le dépistage du vivant de l'animal, l'isolement en culture (méthode de référence), la PCR et la sérologie par ELISA sont les plus appropriées, et les plus utilisées.

Le but de ce travail, était de recenser les informations sur l'épidémiologie de la paratuberculose qui étaient disponibles en France et dans les diverses régions du monde, dans le but d'évaluer la faisabilité de la certification des élevages de bovins, comme c'est déjà le cas dans plusieurs pays. Nous avons formulé des propositions pour permettre une efficacité optimale des plans de lutte applicables dans le cadre de l'élevage bovin en France.

Après analyse des caractéristiques des tests disponibles, dans le contexte épidémiologique de la maladie, ces plans de lutte sont divers et doivent être adaptés en fonction du type d'élevage et selon la prévalence initiale de la maladie au sein du cheptel.

Il existe à ce jour peu de mesures alternatives à la réforme précoce ; notamment l'utilisation de traitements antibiotiques, de mycophages, semble peu réaliste à l'heure actuelle.

La vaccination contre la paratuberculose, qui est interdite en France depuis octobre 2001, pourrait permettre, selon l'expérience passée et les observations réalisées à l'étranger, d'accélérer l'assainissement sous certaines conditions précises. Toutefois, l'utilisation d'un vaccin ne semble pas d'actualité.

Enfin, bien que les aspects économiques n'ai pas été analysés dans le détail dans notre travail, il est probable, dans le contexte actuel de la sécurité sanitaire, qu'un schéma de certification des cheptels vis-à-vis de la paratuberculose, basé initialement sur le volontariat, finira par se mettre en place à plus ou moins court terme en France, comme cela est déjà le cas dans d'autres pays.

Un tel schéma, dont nous avons ici présenté un projet, bénéficierait beaucoup de l'amélioration des techniques de dépistage. En outre, il permettrait de répondre de manière adéquate aux exigences de sécurité sanitaire des productions animales, et se positionnerait comme un outil majeur dans les plans de lutte contre la paratuberculose clinique, en facilitant le remplacement des animaux réformés dans les élevages en cours d'assainissement, ainsi que l'achat des reproducteurs.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mr. CHASTEL Michael

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 6 juillet 2006

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

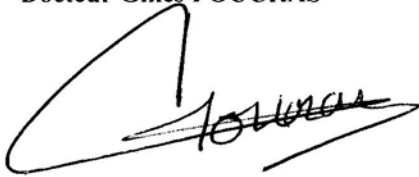
autorise la soutenance de la thèse de :

Mr. CHASTEL Michael

intitulée :

« *Epidémiologie de la paratuberculose des ruminants : conséquences sur les mesures de contrôle et de prévention.* »

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Gilles FOUCRAS**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Henri DABERNAT**



**Vu le : - 7 JAN. 2008
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTÉREAU**



ANNEXES :

Annexe 1: Tableau récapitulatif des temps de survie constatés pour *Map*, souche Bovine, dans différents substrats naturels exposés à des conditions imitant un environnement naturel, ou dans différents modèles de laboratoire

Substrate	Source of bacilli	Estimated starting concn or no. of bacilli ^a	Temp (°C): light	Duration of survival	Reference
In dip fluids, slurry, feces, and urine					
Amitraz cattle dip fluid (pH 12.4)	Naturally infected feces	Uncertain	22	>2, <3 wk	13
Anaerobic bovine slurry (mixture of feces, urine, straw, and water)	Cultured bacilli	10 ⁹ /g	5	>252, <287 days	20
Anaerobic bovine slurry	Cultured bacilli	10 ⁹ /g	15	>98, <112 days	20
Anaerobic bovine slurry	Cultured bacilli	10 ⁹ /g	35	>21, <28 days	29
Anaerobic bovine slurry	Cultured bacilli	10 ⁹ /g	53-55	<1 day	29
Bovine feces and strains	Naturally infected feces, containing orange-pigmented strain ^b	Uncertain	Not recorded	>5 mo	35
Bovine feces	Cultured bacilli	Uncertain	Uncertain	11 mo	38
Bovine feces (liquid) in open bowl	Naturally infected feces	Uncertain	Ambient, -3 to 23; exposed	>246, <284 days	26
Bovine feces in open bowl	Naturally infected feces	Uncertain	Ambient, -2 to 23; exposed	>208, <236 days	26
Bovine feces in open bowl	Naturally infected feces	Uncertain	Ambient, -2 to 23; exposed	<5 mo	26
Caprine feces in open bowl	Naturally infected feces	Uncertain	Ambient, -2 to 23; exposed	>67 days	26
Bovine urine	Cultured bacilli	Uncertain	Uncertain	7 days	38
Bovine urine	Cultured bacilli	10 ⁹ /ml	38; dark	<30 days	25
Bovine urine and feces	Cultured bacilli	10 ⁹ /ml	38; dark	<30 days	25
In water					
Tap water (pH 7)	Cultured bacilli	10 ⁹ /ml	38; dark	>17, <19 mo	25
Tap water (pH 5 or 8.5)	Cultured bacilli	10 ⁹ /ml	38; dark	>14, <17 mo	25
Distilled water, sterile (pH 6.4-6.8), in sealed bottle	Cultured bacilli	10 ⁵ /ml	Ambient, 9 to 26	>9, <13 mo	26
Tap water, sterile (pH 7.1-8.0), in sealed bottle	Cultured bacilli	10 ⁵ /ml	Ambient, 9 to 26	>9, <13 mo	26
Pond water plus mud, sterile (pH 5.3-5.9), in sealed bottle	Cultured bacilli	10 ⁵ /ml	Ambient, 9 to 26	>9, <13 mo	26
River water in bottle	Bovine intestinal scrapings	Uncertain	Ambient, January to May in London (United Kingdom); shade	>113, <141 days	26
River water in open bowl	Bovine intestinal scrapings	Uncertain	Ambient, -7 to 18; shade	>135, <163 days	26
River water in open bowl	Bovine intestinal scrapings	Uncertain	Ambient, -7 to 18; sun	>163, <218 days	26
Distilled water	Cultured bacilli	10 ⁹ /ml	Uncertain	455 days; D value: 69 to 92 days	9
In laboratory models					
Silage model (pH 4.4)	Cultured bacilli	Spotted on paper	30 to 37	<14 days	22
Silage model NH ₃ >1%	Cultured bacilli	Spotted on paper	37	<14 days	23
Saline	Cultured bacilli	10 ⁹ /ml	38; dark	>17, <19 mo	25
Desiccated culture	Cultured bacilli	10 ¹¹	38; dark	>17 mo	25
Desiccated culture	Cultured bacilli	10 ¹¹	38; dark	>47 mo	25
Desiccated culture	Cultured bacilli	10 ¹⁰	-14 for 5 mo, then 4 for 5 mo, then 38 for 8 mo	Viable	25
Desiccated culture	Cultured bacilli	10 ¹⁰	-14 for 12 mo, then 4 for 5 mo	Viable	25
Desiccated culture	Cultured bacilli	10 ¹⁰	Up to 44	>65, <100 h	25
Bovine feces	Naturally infected feces	10 ⁹ /g	-70	>15 wk	34
Bovine feces	Naturally infected feces	>10 ³ /g	-70	>15 wk	33
Bovine feces	Naturally infected feces	<10 ³ /g	-70	>15 wk	33

^a Based on authors' raw data (colony count) or, if no other data given, assuming 1 mg (wet weight) of bacilli = 10⁷ organisms and 1 mg (dry weight) of bacilli = 10⁸ organisms.

^b Strain type uncertain.

Données bibliographiques correspondantes :

9 : COLLINS, M.T., SPAHR, U. et MURPHY, P.M.
Ecological characteristics of *M. paratuberculosis*.
Bulletin of the International Dairy Federation no. 362, 2001, Bruxelles, Belgique, 32-40.

13, G.H., SPENCE, S.A. et TURNER, M.J.
Survival of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in amitraz cattle dip fluid.
Aust. Vet.J., 2001, **79**, 703-706.

- 20 :JORGENSEN, J.B.
Survival of *Mycobacterium avium* in slurry.
Nord. Vetmed, 1977, **29**, 267-270.
- 22 : KATAYAMA, N., TANAKA, C., FUJITA, T. *et al.*
Effect of ensilage on inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Grass Sci, 2000, **46**, 282-288.
- 23 : KATAYAMA, N., TANAKA, C., FUJITA, T. *et al.*
Effect of silage fermentation and ammonia treatment on activity of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Grass Sci., 2001, **47**, 296-299.
- 25 : LARSEN, A.B., MERKAL, R.S., et VARDAMAN, T.H.
Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Am. J. Vet. Res., 1956, **17**, 549-551.
- 26 : LOVELL, R., LEVI, M. et FRANCIS, J.
Studies on the survival of Johne's bacilli.
J. Comp. Pathol., 1944, **54**, 120-129.
- 29 : OLSEN, J.E., JORGENSEN, J.B. et NANSEN, P.
On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic digestion.
Agric. Wastes, 1985, **13**, 273-280.
- 33 : RICHARDS, W.D.
Effects of physical and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*.
J. Clin. Microbiol., 1977, **14**, 587-588.
- 34 : RICHARDS, W.D. et THOEN, C.O.
Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces.
J. Clin. Microbiol., 1977, **6**, 392-395.
- 35 :STUART, P.
A pigmented *M. johnei* strain of bovine origin.
Bre. Vet. J., 1965, **121**, 332-334.
- 38 : VISHNEVSKII, P.P., MAMATSEV, E.G., CHERNYSHEV, V.V. *et al.*
The viability of the bacillus of Johne's disease.
Sov. Vet., 1940, **11-12**, 89-93.

Annexe 2 : Publications utilisant un modèle bovin pour étudier l'infection à *Map*.

Reference	Age of animals	Route of infection	Strain of MAP	Dose(s)	Length of study	Experimental measurements			Clinical disease	
						Histopathology	Tissue culture	Fecal culture		
Rankin (1958)	1 month	IV	Clinical isolate (eight subcultures)	100 mg wet wt	4 years	4/6	6/6	6/6	ND ^a	4/6
Rankin (1961a,b,c)	3 years	IV	Clinical isolate (eight subcultures)	100 mg wet wt	4 years	1/5	5/5	0/5	ND ^a	0/5
Rankin (1961a,b,c)	1, 3, 6 months	Fecal-oral exposure	Clinical isolate	Unknown	5 years	9/9	9/9	8/9	ND ^a	4/9
Payne and Rankin (1961a,b)	3 months	Oral (milk)	Clinical isolate	200 mg wet wt	Variable up to 14 months	Increased with period of infection	Variable	ND ^a	ND ^a	No
Payne and Rankin (1961a,b)	3 months or 3 years	Oral (milk or water)	Clinical isolate	200 mg wet wt	Variable up to 6 months	Increased with period of infection	6/8 calves, 1/8 cows	ND ^a	ND ^a	No
Rankin (1962)	Variable	Fecal-oral exposure	Clinical isolate	Unknown	4 years	6/6 calves, 1/7 cows	4/7 cows	6/6 calves, 4/7 cows	Skin test+, CFT-	5/6 calves, 1/7 cows
Gilmour et al. (1965)	3 weeks	Oral (tube)	Clinical isolate	1 × 10 ⁸ , 1 × 10 ¹⁰ , 1 dose × 10 weeks	Variable up to 13 months	Increased with period of infection and dose	Increased with period of infection and dose	ND ^a	Skin test+	No
Stuart (1965)	1 week	IV	Clinical isolate	100 mg wet wt	10 months	18/40	NR ^b	40/40	CFT+	Yes
Larsen et al. (1978)	1 month	Oral (natural exposure)	Naturally infected cows	Unknown	Up to 6 years	22/175	31/175	20/175	Skin test+	Yes
Larsen et al. (1973)	16 days	Oral (milk)	Clinical isolate	180 mg wet wt	5 months	8/8	7/8	8/8	Skin test+	No
Thorel et al. (1984)	4 weeks	IV	Various isolates of MAP	1 × 10 ⁹	12 months	8/23	23/23	ND ^a	ND ^a	No
Krishnaappa et al. (1989)	NR calves	Oral	Clinical isolate from mucosal scrapings	50 g 1 dose × 10 weeks	30 weeks	ND ^a	ND ^a	1/12	AGID+, CIE+	No
Szilagyi et al. (1989)	17 days	Oral	Strain 5889	1 × 10 ⁸ , 2 × 5 doses with 15 days between	400 days	ND ^a	NR ^b	NR ^b	NR ^b	No
Savagaard (1990)	4 weeks	Oral (milk)	Clinical goat isolate from tissue	10 mg wet wt; 10 doses over 10 days	Variable up to 18 months	No	4/4	ND ^a	ELISA-	No
McDonald et al. (1999)	2 months	Oral (gastric tube)	Clinical isolate	2 g wet wt 3 doses	Up to 27 months	2/4	1/4	2/4	IFN-γ+, ELISA-, IFN-γ+	No
McDonald et al. (1999)	2 months	Oral (gastric tube)	Clinical isolate	20 g wet wt 3 doses	Up to 27 months	4/4	4/4	4/4	ELISA-, IFN-γ+	No
Beard et al. (2001)	1 week	Oral	Rabbit and bovine isolate	1 × 10 ⁹ , 3 doses 1 ×/week 6 months	3/8—rabbit, 2/4—bovine	3/8—rabbit, 2/4—bovine	7/8—rabbit, 3/4—bovine	5/8—rabbit, 0/4—bovine	ND ^a	No
Waters et al. (2003)	2 weeks	ITS	Strain K-10	1.6 × 10 ⁷ , 1 × 4 weeks	320 days	0/3	3/3	0/3	IFN-γ+, ELISA+	No
Uzonna et al. (2003)	28 days	Oral (milk)	Clinical isolate	1 × 10 ¹⁰ , 2 doses	49 days	0/15	15/15	ND ^a	IFN-γ+, ELISA-	No
Koo et al. (2004)	1-2 days	Oral	NR	1 × 10 ⁷ , 7 doses	6 months	ND	2/3-PCR	ND ^a	IFN-γ+, ELISA-	No
Simutis et al. (2005)	4 weeks	SC	Strain 19698	1 × 10 ⁸	150 days	0/25	1/25	0/25	IFN-γ+, Skin test+	No
Stabel et al. (2003)	4 months	Oral (gastric tube)	Clinical isolate (bovine and bison)	1 × 10 ⁹ , 5 doses	6 months	0/6—cattle, 0/6—bison	5/6—cattle, 6/6—bison	1/6—cattle, 2/6—bison	IFN-γ+, ELISA-	No
Sweeney et al. (2006)	2-3 days	Oral (milk)	Clinical isolate (ATCC 700533)	2.5 × 10 ¹⁰ , 2 doses	44 days	0/6/6	60/6	0/6	ND ^a	No
Sweeney et al. (2006)	21-22 days	Oral (milk)	Clinical isolate (ATCC 700533)	H-5 × 10 ⁸ , M-5 × 10 ⁸ , L-1.5 × 10 ⁶	44 days	H-0/8, M-0/6, L-0/6	H-8/8, M-6/6, L-6/6	H-0/8, M-0/6, L-0/6	ND ^a	No
Koets et al. (2006)	1 month	Oral (feces in milk)	Clinical cow feces (high shedder)	20 g, 9 doses	644 days	ND ^a	ND ^a	8/10	IFN-γ+, ELISA+	No
Rosseels et al. (2006a,b)	2-3 weeks	Oral	Strain 19698	1 × 10 ⁸ , 10 doses	875 days	ND ^a	ND ^a	NR ^b	Skin test+, ELISA-	No
Wu et al. (2007)	3-4 weeks	Ileum injection	Strain K-10, Strain 19698, AggP mutant	1 × 10 ⁷ to 1 × 10 ⁸ , 1 dose	4 days to 9 months	5/5	5/5	0/5	Skin test-, ELISA-, IFN-γ+, TNFα+, IL12+, IL4-	No

AGID = agar gel immunodiffusion test; CFT = complement fixation test; CIE = crossed immunoelectrophoresis; ITS = Intratonsillar; IV = Intravenous; H = High dose; M = Medium dose; L = Low dose.

^a ND = not determined.

^b NR = not reported.

Annexe 3 : Publications utilisant un modèle ovin pour étudier l'infection à *Map*.

Reference	Age of animals	Route of infection	Strain of MAP	Dose(s)	Length of study	Experimental measurements				Clinical disease
						Histopathology	Tissue culture	Fecal culture	Immune response	
Brotherston et al. (1961)	10 weeks	IV	Sheep isolate (var bovine)	1×10^7	Up to 22 months	ND ^a	13/16	ND ^a	ND ^a	No
	1 week	Oral		1×10^8 , 1×10^9	53 weeks	ND ^a	10/16	ND ^a	ND ^a	No
	7-10 days	Oral		1×10^8 , 1×10^9	53 weeks	ND ^a	9/9	ND ^a	ND ^a	No
	3 weeks	Oral		1×10^8 , 1×10^9	Up to 9 months	ND ^a	24/51	ND ^a	ND ^a	Yes
Gilmour and Brotherston (1962)	8 months	Oral	Sheep isolate (var. bovine)	1×10^9	Up to 56 days	ND ^a	10/12	ND ^a	ND ^a	No
	1 week	Oral	Sheep isolate (var. bovine)	1×10^8	53 weeks	6/12	ND ^a	ND ^a	ND ^a	NR
Nisbet et al. (1962)	7-10 days	Oral	Sheep isolate (var. bovine)	1×10^8 , 1×10^9	53 weeks	7/9	ND ^a	ND ^a	ND ^a	NR
	3 weeks	Oral		1×10^8 , 1×10^9	Up to 9 months	20/35	23/35	ND ^a	ND ^a	NR
	3 months	Oral		1×10^8 , 1×10^9	Up to 9 months	5/12	6/12	ND ^a	ND ^a	NR
		Oral		1×10^8	Up to 9 months					
Gilmour and Brotherston (1966)	3 months, 10 months	Oral	Sheep isolate (var bovine)	1×10^8 , 1×10^9	Up to 18 weeks	ND ^a	6/9, 9/9	ND ^a	Skin test+	NR
	3 weeks	IV	Clinical bovine isolate (tissue)	50 mg dry wt 50 mg dry wt 200 mg dry wt	Up to 16 months	Yes	NR ^b	NR ^b	NR ^b	Yes
Merkal et al. (1968a,b)	3 weeks	IV	Clinical bovine isolate (tissue)	50 mg dry wt 50 mg dry wt 200 mg dry wt	Up to 16 months	Yes	NR ^b	NR ^b	Skin test+, CFT+, AGID+	Yes
		IT								
		Oral (milk)								
Gilmour et al. (1978)	5 months	Oral	Sheep isolate (three passages)	1×10^9 , 1×10^{10}	Up to 27 months	15/22	11/22	ND ^a	Skin test +	Yes
	4-5 months	Oral	Clinical sheep isolate	50 mg wet wt	Up to 12 months	ND ^a	5/9	0/9	ND	No
Williams et al. (1983a)	3 months	Oral	Bovine isolate (three passages)	150 mg wet wt, 2 doses	220 days	Yes	Yes	0/5	ELISA +	No
		Oral	Deer isolate	1×10^8 , 1×10^9	NR	ND ^a	ND ^a	ND ^a	IFN- γ +, LBT+	No
Begara-McGorum et al. (1998)	5-9 days	Oral	Deer isolate	1×10^9	Up to 41 days	4/8	3/8	1/8	IFN- γ - ELISA-	No
		Oral	Strain JD88/107	3×2 days						
Gwozdz and Thompson (2002)	1-4 weeks	Oral (gastric tube)	Clinical sheep isolate (tissue)	3.4×10^8 4.4×10^8	108 weeks 53 weeks	1/10 3/9	1/10-PCR 4/9-PCR	ND ^a	IFN- γ +, ELISA+ AGID+, CFT+	Yes
	1-2 months	Oral (gastric tube)	Clinical sheep isolate (tissue)	4.4×10^8	53 weeks	9/14	10/14-PCR	3/14-PCR	IFN- γ +, ELISA+	Yes
Gwozdz et al. (2001)	1-4 weeks	Oral (gastric tube)	Clinical sheep isolate (tissue)	3.4×10^9	108 weeks	18/28	ND ^a	ND ^a	ND ^a	Yes
	12-16 weeks	Oral	Sheep isolate (feces)	2.6×10^1 1×10^4 1×10^8 3×1 week 10×1 week		0/30	0/12 0/12 6/6	0/30	IFN- γ +, Skin test+ ELISA+	No
Kurade et al. (2004)	8-12 weeks	Oral	Clinical sheep isolate (tissue)	1×10^{10} 8×3 days	Up to 330 days	20/20	7/20	3/20	LBT+ ELISA+	Yes

Reference	Age of animals	Route of infection	Strain of MAP	Dose(s)	Length of study	Experimental measurements				Clinical disease	
						Histopathology	Tissue culture	Fecal culture	Immune response		
Stewart et al. (2004)	6 months	Oral	Clinical bovine isolate (tissue/culture)	1×10^{10}	54 months	NR ^b	1/5	7/10	IFN- γ ⁺	Yes	
	10 months		Clinical sheep isolate (tissue/culture)	20 g wet wt	35 months		1/5	5/10	ELISA ⁺	Yes	
Begg et al. (2005)	12 weeks	Oral	Clinical sheep isolates	1×4 weeks	10 months	17/30	21/30	NR ^b	IFN- γ ⁺	No	
		Oral	(JD3-tissue and W-high and low passage culture)	4×3 days	13 months	22/30	16/30	NR ^b	LBT ⁺ ELISA ⁺	Yes	
	IT Oral Oral			5×10^8	16 months	7/12	8/12	NR ^b			No
				1×10^9		9/12	8/12				
				1×3 weeks		1/12	3/12				
Begg et al. (2005)	2.5 months	Oral	Clinical sheep isolate—JD3	5×10^8 , 1×3 weeks	Up to 22 months	23/30	NR ^b	NR ^b	IFN- γ ⁺ , LBT ⁺ , ELISA ⁺	Yes	

AGID = agar gel immunodiffusion test, CFT = complement fixation test, LBT = lymphocyte blastogenesis test, IT = Intratracheal, IV = Intravenous.

^a ND = not determined.

^b NR = not reported.

Annexe 4 : Publications utilisant un modèle caprin pour étudier l'infection à *Map*.

Reference	Age of animals	Route of infection	Strain of MAP	Dose(s)	Length of study	Experimental measurements				
						Histopathology	Tissue culture	Fecal culture	Immune response	Clinical disease
Harding (1957)	NR ^a	IT IV IV/ Oral	NR ^a	NR ^a	9–16 months	23/24	17/24	ND ^b	ND ^b	NR ^a
Van Kruijningen et al. (1986)	2–12 days	Oral (milk)	Human isolate Linda	3.2 × 10 ⁷ , 4.0 × 10 ⁸ , 50 mg wet wt	Up to 310 days	4/4	4/4	1/4	ND ^b	No
Sigurdardottir et al. (1999)	7–26 days	Oral (milk)	Clinical goat isolate (three passages)	10 mg dry wt, 1 × 10 days	Up to 49 weeks	3/8	2/8	0/8	Skin test+, ELISA+, CFT+	No
Sigurdardottir et al. (2001)	18–21 days	Distal ileal ligation	Clinical goat isolate	2.365 mg dry wt/3 ml, 4 loops	1 h	MAP in M cells and leukocytes	ND ^b	ND ^b	ND ^b	No
Sigurdardottir et al. (2001)	23–39 days	Everted intestine sleeve	ATCC bovine strain 19698	3 × 10 ⁷ per sleeve	1 h	MAP uptake by M cells and enterocytes	ND ^b	ND ^b	ND ^b	No
Storset et al. (2001)	5–8 weeks	Oral (milk)	Clinical goat isolate (P173)	10 mg, 3 × 10 weeks	Up to 117 weeks	6/7	5/7	4/7	IFN-γ+, LBT+, ELISA+	Yes
Valheim et al. (2002)	5–8 weeks	Oral (milk)	Clinical goat isolate (P173)	10 mg, 3 × 10 weeks	Up to 117 weeks	6/7	5/7	ND ^b	ND ^b	Yes
Munjal et al. (2005)	5–8 weeks	Oral	Clinical goat isolate (tissue)	1 × 10 ¹⁰ , 7 × 2 days	Up to 270 days	5/10	2/10 (PCR)	1/10	LBT+, ELISA+, AGID+	Yes
Stewart et al. (2006)	5 months 10 months	Oral	Clinical bovine isolate (tissue/culture) Clinical sheep isolate (tissue/culture)	1 × 10 ¹⁰ , 20 g wet wt 1 × 4 weeks	54 months 35 months	NR ^a	8	10/10	IFN-γ+, ELISA+	Yes Yes
Hines et al. (2007)	6 weeks	Oral	Clinical goat isolate	1.5 × 10 ⁹ , 4 × alternate days	6–9 months	Yes	Yes	Yes	IFN-γ+, Skin test+, ELISA+	Yes

AGID = agar gel immunodiffusion test; CFT = complement fixation test; LBT = lymphocyte blastogenesis test; IT = Intratracheal; IV = Intravenous.

^a NR = not reported.

^b ND = not determined.

Annexe 5 : Publications utilisant un modèle de ruminant sauvage pour étudier l'infection à *Map*.

Reference	Species	Age of animals	Route of infection	Strain of MAP	Dose(s)	Length of study	Experimental measurements				
							Histopathology ^a	Tissue culture	Fecal culture	Immune response	Clinical disease
Williams et al. (1983a)	Bighorn × mouflon	4–5 months	Oral	Clinical bighorn sheep isolate	50 mg wet wt	6 or 12 months	8/9	9/9	NR ^b	ND ^c	No
	Mule deer						8/8	8/8		Yes	
	White-tail deer						2/2	2/2		Yes	
Williams et al. (1983b)	Elk	4–5 months	Oral	Clinical bighorn sheep isolate	50 mg wet wt	6 or 12 months	NR ^b	9/9	9/9	ND ^c	No
	Bighorn × mouflon						8/8	2/8		Yes	
	Mule deer						2/2	0/2		Yes	
Mackintosh et al. (2003)	White-tail deer	4 months	Oral	Clinical deer isolate (bov var)	NR, 1 × 4 days	12 months	39/43	NR ^b	NR ^b	Skin test+, LBT+, ELISA+	Yes
	Elk						8/8	0/8		No	
	Red deer						42/42	NR ^b	NR ^b	LBT+, ELISA+	Yes
Mackintosh et al. (2005)	Red deer	4 months	Oral	Clinical deer isolate (tissue; bov var)	1 × 10 ⁹ , 1 × 4 days	12 months	42/42	NR ^b	NR ^b	LBT+, ELISA+	Yes
	Red deer										
	Red deer										
O'Brien et al. (2006)	Red deer	4 months	Oral	Clinical red deer isolate (tissue; bov var)	1 × 10 ⁹ , 1 × 10 ⁷ , 1 × 10 ³ , 1 × 4 days	Up to 44 weeks	Lesions apparent	40/64	NR ^b	IFN-γ+, LBT+	NR ^b
	Red deer						Lesions apparent				
	Red deer						Lesions apparent				
Mackintosh et al. (in press)	Red deer	4 months	Oral	Clinical sheep isolate (JD3; tissue)	1 × 10 ⁷ , 1 × 4 days	12 months	NR ^b	8/16 LB, 16/16 MB	NR ^b	LBT+, IFN-γ+	NR ^b
	Red deer						NR ^b	8/16 LB, 16/16 MB	NR ^b	LBT+, IFN-γ+	NR ^b
	Red deer						NR ^b	8/16 LB, 16/16 MB	NR ^b	LBT+, IFN-γ+	NR ^b
Stabel et al. (2003)	Bison	4 months	Oral (gastric tube)	Clinical isolate (bovine and bison)	1 × 10 ⁹ , 5 doses	6 months	0/6	6/6	2/6	IFN-γ+, ELISA–	No
	Bison						0/6	6/6	2/6	IFN-γ+, ELISA–	No
	Bison						0/6	6/6	2/6	IFN-γ+, ELISA–	No

^a In the cervid model histopathology following necropsy may be used to stratify disease severity. LBT = lymphocyte blastogenesis test.

^b NR = not reported.

^c ND = not determined.

BIBLIOGRAPHIE :

ANGUS, K.

Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).
Journal of Comparative Pathology, 1990, **103**, 22-23.

AYELE, W.Y., BARTOS, M., SVASTOVA, P. *et al.*

Distribution of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding-bulls.
Veterinary Microbiology., 2004, **103**, 209-217.

BANROFT, J.D. et STEVENS, A.

Theory and practice of histological techniques, 4th Edition.
Churchill Livingstone, 1996, New-York.

BAO, J., GILLER, P.S. et STAKELUM, G.

Selecting grazing by dairy cows in the presence of dung and the defoliation of tall grass dung patches.
Animal Science, 1998, **66**, 65-73.

BEARD, P.M., DANIELS, M.J., HENDERSON, D. *et al.*

Paratuberculosis infection of non-ruminant wildlife in Scotland.
Journal of Clinical Microbiology, 2001a, **39**, 1517-1521.

BEARD, P.M., RHIND, S., BUXTON, D. *et al.*

Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland.
Journal of Comparative Pathology, 2001b, **124**, 290-299.

BEARD, P.M., STEVENSON, K., PIRIE, A. *et al.*

Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Journal of Clinical Microbiology, 2001c, **39**, 3080-3084

BEGG, D.J. et GRIFFIN, J.F.T

Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis* : immune parameters and protective efficacy.
Vaccine, 2005a, **23**, 4999-5008.

BEGG, D.J., O'BRIEN, R., MACKINTOSH, C.G. *et al.*

Experimental infection model for Johne's disease in sheep.
Infection and immunity, sept.2005b, **73**, 5603-5611.

BENEDICTUS, G., VERHOEFF, J., SCHUKKEN, Y.H. *et al.*

Dutch paratuberculosis programme history, principles and development.
Veterinary Microbiology, 2000, **77**, 399-413.

BERMUDEZ, L.E., PETROFSKY, M. et GOODMAN, J.

Exposure to low oxygen tension and increased osmolarity enhance the ability of *Mycobacterium avium* to enter intestinal epithelial cells.
Infection and Immunity, 1997, **65**, 3768-3773.

- BERNSTEIN, C.N., WANG, M.H., SARGENT, M. *et al.*
Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease.
Journal of Clinical Microbiology, 2007, **45**, 968-971.
- BIELANSKI, A., ALGIRE, J., RANDALL, G.C.B. *et al.*
Risk of transmission of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos.
Theriogenology, 2006, **66**, 260-266.
- BONNET, J.N., GOUNOT, G., GUERIN, D. *et al.*
Les enjeux de la certification, rapport du groupe de travail relatif à la certification en paratuberculose bovine.
ACERSA, France, 2002, 88 pages.
- BOSSHARD, C., STEPHAN, R. et TASARA, T.
Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bull tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows.
J. Food Prot., 2006, **69**, 1662-1667.
- BOTTCHER, J., et GANGL A.
Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis – Combined serological testing and classification of individual animals and Herds.
- BOURZEIX, T.
Contribution à l'étude épidémiologique de la paratuberculose bovine dans le département du Cher. Mesures prophylactiques envisageables.
Th. : Med. Vet. : Nantes : 1994, 28.07.
- BRANT, S.R. *et al.*
MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease.
American Journal of Human Genetics, 2003, **73**, 1282-1292.
- BRUGERE-PICOUX, J.
Le diagnostic de la paratuberculose des ruminants.
Recueil de médecine vétérinaire, 1987, **163**, 539-546.
- BRUGERE-PICOUX, J., MAILLARD R. et DOUART, A.
Paratuberculose : quels tests de diagnostic utiliser ?
Le Point Vétérinaire, 2001, **201**, 50-53.
- BRUMBAUGH, G.W., EDWARDS, J.F., ROUSSEL Jr., A.J. *et al.*
Effect of monensin sodium on histological lesions of naturally occurring bovine paratuberculosis.
Journal of Comparative Pathology, 2000, **123**, 22-28.

- BUERGELT, C.D. GINN, P.E.
The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison Bison*).
Veterinary Microbiology, 2000a, **77**, 325-331.
- BUERGELT, C.D., LAYTON, A.W., GINN, P.E. *et al.*
The pathology of spontaneous paratuberculosis in North American bison (*Bison bison*).
Veterinary Pathology, 2000b, **37**, 428-438.
- BULL, T.J., MCMINN, E.J., SIDI-BOUMEDINE, K. *et al.*
Detection and verification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease.
Journal of Clinical Microbiology, 2003, **41**, 2915-2923.
- CHIODINI, R.J. VAN KRUININGEN, H.J
Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis.
Journal of American Veterinary Medicine Association, 1983, **182**, 168-169.
- COLLINS, C.H., GRANGE, J.M., YATES, M.D.
Mycobacteria in water.
Journal of Applied Microbiology, 1984, **57**, 193-211.
- COLLINS, M.T.
Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Irish Veterinary Journal, 2003, **56**, 565-574.
- COLLINS, M.T.
Spreadsheet model for estimating the probability herds are free of paratuberculosis after successive serial tests.
In : Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis.
Melbourne, Australie, 2000a, 66-75.
- COLLINS, M.T. et MORGAN, I.R.
Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program.
Journal of American Veterinary Medicine Association, 1991, **199**, 1724-1729.
- COLLINS, M.T., GARDNER, I.A., GARRY, F.B. *et al.*
Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of parauberculosis in cattle in the United States.
Journal of American Veterinary Medicine Association, 2006, **229**, 1912-1919.
- COLLINS, M.T., LISBY, G., MOSER, C. *et al.*
Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls.
Journal of Clinical Microbiology, 2000b, **38**, 4373-4381.
- COLLINS, M.T., WELLS, S.J., PETRINI, K.R. *et al.*
Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of Bovine paratuberculosis.
Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2005, **12**, 685-692.

- CORN, J.L., MANNING, E.J.B., SREEVASTAN, S. *et al.*
Isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises.
Applied and environmental microbiology, 2005, **71**, 6963-6967.
- CORNER, L.A., PFEIFFER, D.U et ABBOTT, K.A.
The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Australian Veterinary Journal, 2004, **82**, 170-173.
- CORTI, S. et STEPHAN, R.
Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bull-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland.
BMC Microbiol., 2002, **2**, 15.
- COTTEREAU P.
La paratuberculose des Ruminants.
Cahiers de Médecine Vétérinaire, 1970, **43** (6), 275-289.
- COUSINS, D.V., WHITTINGTON, R., MARSH, I. *et al.*
Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction : implications for diagnosis.
Mol Cell Probes, 1999, **13**, 431-442.
- DANIELS, M.J., BALL, M., HUTCHINGS, R. *et al.*
The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis.
The Veterinary journal, 2001, **161**, 306-313.
- De LISLE, G.W., YATES, G.F., MONTGOMERY, R.H.
The emergence of *Mycobacterium paratuberculosis* in farmed deer in New Zealand – a review of 619 cases.
New-Zealand Veterinary Journal, 2003, **51**, 58-62.
- DUERR, R.H. *et al.*
A genome-wide association study identifies *IL23R* as an inflammatory bowel disease gene.
Science, 2006, **314**, 1461-1463.
- DUFOUR, B., POUILLOT, R. et DURAND, B.
A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds.
Veterinary Research, 2004, **35**, 69-81.
- EAMENS, G.J., TURNER, M.J. et WHITTINGTON, R.J.
Sampling and repeatability of radiometric faecal culture in bovine Johne's disease.
Veterinary Microbiology, 2007a, **119**, 184-193.

- EAMENS, G.J., WALKER, D.M., PORTER, N.S. *et al.*
Pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in goats.
Australian Veterinary Journal, 2007b, **85-6**, 243-251.
- ELLINGSON, J.L., BOLIN, C.A., et STABEL, J.R., 1998
Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis.
Mol Cell Probes, 1998, **12**, 133-142.
- EMERY, D.L. et WHITTINGTON, R.J.
An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection.
Veterinary Microbiology, 2004, **104**, 143-155.
- ENGLUND, S., BOLSKE, G., JOHANSSON, K.E.
An IS900-like sequence found in a other *Mycobacterium sp.* Other than *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* .
FEMS Microbiol. Lett., 2002, **209**, 267-271.
- EZANNO, P., VAN SCHAIK, G., WEBER, M.F. *et al.*
A modeling study on the sustainability of a certification-and-monitoring program for paratuberculosis in cattle.
Veterinary Research, 2005, **36**, 811-826.
- FALKINHAM, J.O., III
Mycobacterial aerosols and respiratory disease.
Emerg. Infect. Dis., 2003, **9**, 763-767.
- FISCHER, O., MATLOVA, L., DVORSKA, P. *et al.*
Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs.
Medical and Veterinary Entomology, 2001, **15**, 208-211.
- FISCHER, O.A., MATLOVA, L., DVORSKA, L., *et al.*
Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium subsp. avium*, *M.a. paratuberculosis* and *M. a. Hominisuis*.
Medical and Veterinary Entomology, 2004, **18**, 116-122.
- FISCHER, O.A., MATLOVA, L., DVORSKA, L., *et al.*
Larvae of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*), as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis.
Medical and Veterinary Entomology, 2003a, **17**, 145-150.
- FISCHER, O.A., MATLOVA, L., DVORSKA, L., *et al.*
Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria.
Veterinary Microbiology, 2003b, **91**, 325-338.

FRIGIERE, Y.

Programme national pour la maîtrise de la paratuberculose en élevage bovin cliniquement infecté.

Bulletin des GTV-Hors-série paratuberculose des ruminants, 2002, 29-36.

GAUTHIER, B.

Populations cellulaires mises en jeu dans la paratuberculose bovine.

Th. : Med. Vet. : Toulouse : 1996.

GLAWISCHNIG, W., AWAD-MASALMEH, M., KHASCHABI, D. *et al.*

Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal.

Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 2004, **117**, 136-139.

GODDEN, S., MCMARTIN, S., FEIRTAG, J. *et al.*

Heat-treatment of bovine colostrum. II : effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G.

Journal of Dairy Science, 2006, **89**, 3476-3483.

GONDA, M.G., CHANG, Y.M., SHOOK, G.E. *et al.*

Genetic variation of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* infection in the US holsteins.

Journal of Dairy Science, 2006, **89**, 1804-1812.

GONDA, M.G., KIRKPATRICK, B.W., SHOOK, G.E. *et al.*

Identification of a QTL on BTA20 affecting susceptibility to *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* infection in the US holsteins.

Animal Genetics, 2007, **38**, 389-396.

GRANT, I.R.

Zoonotic potential of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* : the current position.

Journal of applied microbiology, 2005a, **98**, 1282-1293.

GRANT, I.R., BALL, H.J. et ROWE, M.T.

Incidence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in bull raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom.

Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**, 2428-2435.

GRANT, I.R., BALL, H.J., NEILL, S.D. *et al.*

Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures.

Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**, 631-636.

GRANT, I.R., WILLIAMS, A.G., ROWE, M.T. *et al.*

Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk.

Applied and environmental microbiology, 2005b, **71**, 2853-2861.

GREIG, A., STEVENSON, K., PEREZ, V., *et al.*
Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).
The Veterinary Record, 1997, **140**, 141-143

GREWAL, S.K., RAJEEV, S., SREEVATSAN, S. *et al.*
Persistence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure.
Applied and environmental microbiology, 2006, **72**, 565-574.
HAMPE, J., FRANKE, A., ROSENSTIEL, P. *et al.*
A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*.
Nature Genetics, 2007, **39**, 207-211.

HARRIS, N.B. et BARLETTA, R.G.
Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in veterinary medicine.
Clinical microbiology reviews, 2001, **14**, 489-512.

HENDICK, S.H., KELTON, D.F., LESLIE, K.E. *et al.*
Efficacy of monensin sodium for the reduction of fecal shedding of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in infected dairy cattle.
Preventive Veterinary Medicine, 2006, **75**, 206-220.

HINES II, M.E., STIVER, S., GIRI, S. *et al.*
Efficacy of spheroplastic and cell-wall component vaccines for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in experimentally-challenged baby goats.
Veterinary Microbiology, 2007, **120**, 261-283.

HUDA, A. et JENSEN, H.E.
Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of ovine paratuberculosis.
Journal of Comparative Pathology, 2003, **129**, 259-267.

HUTCHING M.R., DANIELS, M.J., HENDERSON, D. *et al.*
Potential wildlife to ruminant transmission routes for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
In : Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis.
Bilbao, Spain, 2002.

HUTCHING, M.R., HARRIS, S.
The effects of farm management practices on cattle grazing behaviour and the potential for transmission of bovine paratuberculosis from badgers to cattle.
The Veterinary Journal, 1997, **153**, 149-162

IKONOMOPOULOS, J., BALASKAS, C., KANTZOURA, B. *et al.*
Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in clinically healthy sheep and goats in South-West Greece using molecular techniques, serology, and culture.
The Veterinary Journal, 2007, **174**, 337-343.

- JOLY, A. et POURQUIER, P.
 Evaluation de l'impact de la vaccination sur le comportement sérologique des bovins par une technique ELISA.
 Bulletin des GTV-Hors-série paratuberculose des ruminants, 2002, 61-65.
- JORGENSEN, J.B.
 Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry.
 Nord. Vet. Med., 1977, **29**, 267-270.
- JUDGE, J., KYRIAZAKIS, I., GREIG, A. *et al.*
 Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study.
 Applied and Environmental Microbiology, jan. 2006, **72**, 398-403.
- JUNGERSEN, G., HUDA, A., HANSEN, J.J. *et al.*
 Interpretation of the interferon-gamma test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle.
 Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **9**, 453-460.
- KALIS, C.H.J., COLLINS, M.T., HESSELINK, J.W. *et al.*
 Tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis on cell-mediated immunity : the Johnin skin test and the gamma interferon assay.
 Veterinary Microbiology, 2003, **97**, 73-86.
- KATAYAMA, N., TANAKA, C., FUJITA, T. *et al.*
 Effect of ensilage on inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
 Grass Science, 2000, **46**, 282-288.
- KATAYAMA, N., TANAKA, C., FUJITA, T. *et al.*
 Effect of silage fermentation and ammonia treatment on activity of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
 Grass Science, 2001, **47**, 296-299.
- KESWANI, J. et FRANK, J.F.
 Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk.
 J. Food Prot., 1998, **61**, 974-978.
- KFICHT, T.A., SANTOS, R.L. *et al.*
 Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in bovine milk and faeces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real time PCR.
 Journal of clinical microbiology, 2004, **42**, 1075-1081.
- KOETS, A.P., ADUGNA, G., JANS, L.G. *et al.*
 Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in dairy cattle.
 Journal of Dairy Sciences, 2000, **83**, 2702-2708.

- KOHLER, H. et BURKERT, B.
Validierung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* bei Rindern.
IVD-Infol der BFAV Insel Riems, 2003, **3**, 6-9.
- KURADE, N.P., TRIATHI, B.N., RAJUKUMAR, K. *et al.*
Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Veterinary Pathology, 2004, **41**, 378-387.
- LAMBETH, C., REDDAKLIFF, L.A., WINDSR, P. *et al.*
Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in sheep.
Australian Veterinary Journal, 2004, **82**, 504-508.
- LI, L., BALLANTINE, J.P., ZHANG, Q. *et al.*
The complete genome sequence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**, 12344-12349.
- LLOYD, J.B., WHITTINGTON, R.J., FITZGIBBON, C. *et al.*
Presence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium.
Veterinary Research, 2001, **148**, 261-263.
- LOPEZ-PEDEMONTE, T., SEVILLA, I., GARRIDO, J.M. *et al.*
Inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cow's milk by means of high hydrostatic pressure at mild temperatures.
Applied and environmental microbiology, 2006, **72**, 4446-4449.
- MANNING, E.J.
Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* : a review of current knowledge.
Journal of Zoo and Wildlife Medecine, 2001, **32**, 293-304.
- MANNING, E.J.B., KUCERA, T.E., GATES, N.B. *et al.*
Testing for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd.
Journal of Wildlife Disease., 2003, **39**, 323-328.
- MARSH, I.B., BANNANTINE, J.P., PAUSTIAN, M.L. *et al.*
Genomic comparison of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Sheep and Cattle strains by microarray hybridization.
Journal of bacteriology, 2006, **188**, 2290-22963.
- MATTHEWS, P.R.J., SARGENT, A.
The isolation of mycobacteria from the the brown hare (*Lepus europaeus*).
British Veterinary Journal, 1977, **133**, 399

- Mc CLURE, H.M., CHIODINI, R.J., ANDERSON, D.C. *et al.*
Mycobacterium paratuberculosis infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*).
 Journal of Infectious Diseases, 1987, **155**, 1011-1019.
- Mc DONALD, W.L., O'RILEY, K.J., SCHROEN, C.J. *et al.*
 Heat inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk.
 Applied and Environmental Microbiology, 2003, **71**, 1785-1789.
- MC DONALD, W.L., RIDGE, S.E., HOPE, A.F. *et al.*
 Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle.
 Australian Veterinary Journal, 1999, **177**, 113-119.
- Mc GOVERN, D.P. *et al.*
 Association between a complex insertion/deletion polymorphism in *NOD1 (CARD4)* and susceptibility to inflammatory bowel disease.
 Human Molecular Genetics, 2005, **14**, 1245-1250.
- MC KENNA, S.L.B., BARKEMA, H.W., KEEFFE, G.P. *et al.*
 Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy cattle.
 Veterinary Microbiology, 2006, **114**, 285-291.
- MEYLAN, M., RINGS, D.M., SHULAW, W.P. *et al.*
 Survival of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization.
 American Journal of Veterinary Research, 1996, **57**, 1580-1585.
- MISHINA, D., KATSEL, P., GILBERTS, E.C. *et al.*
 On the etiology of Crohn disease.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, **93**, 9816-9820.
- MOKRESH, A.H., BUTLER, D.G.
 Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin.
 Canadian Journal of Veterinary Research, 1990, **54**, 313-319.
- MORTENSEN, H., NIELSEN, S.S., et BERG, P.
 Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in Danish Holstein cows.
 Journal of Dairy Sciences, 2004, **87**, 2108-2113.
- MUNJAL, S.K., TRIPATHI, B.N., PALIWAL, O.P. *et al.*
 Application of different methods for the diagnosis of experimental paratuberculosis in goats.
 Zoonoses and Public Health, 2007, **54**, 140-146.

- MURA, M., BULL, T.J., EVANS, H. *et al.*
Rand long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* with *Acanthamoeba polyphaga*.
Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**, 854-859.
- NACKMOON, S., and T. COLLINS M.
Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Applied and environmental Microbiology, 1998, **64**, 999-1005.
- NASER, S.A., SCHWARTZ, D., SHAFRAN, I.
Isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients.
American Journal of Gastroenterology, 2000, **95**, 1094-1095.
- NEBBIA, P.
Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by nested-PCR .
Small ruminants research, 2006, **66**, 116-120.
- NEWMAN, B., SIMINOVITCH, K.
Inflammatory bowel disease : Crohn's disease and the success of the NODern genetics.
Clin. Invest. Med., 2003, **26**, 303-314.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES
International Health Code.
Paris, France, 2001.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES
Manuel of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.
2000.
- OSTERSTOCK, J.A., FOSGATE, G.J., COHEN, N.D. *et al.*
Familial associations with paratuberculosis ELISA results in Texas Longhorn cattle.
Veterinary Microbiology, 2007.10.027.
- PARKES, M., BARRETT, J., PRESCOTT, N. *et al.*
Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility.
Nature Genetics, 2007, **39**, 830-832.
- PATEL, D., DANELISHVILI, L., YAMAZAKI, Y., *et al.*
The ability of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells.
Infection and Immunity, 2006, **74**, 2849-2855.
- PERRY, G.H., VIVANCO, H., HOLMES, I. *et al.*
No evidence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in in vitro produced cryopreserved embryos derived rom suclinically infected cows.
Theriogenology, 2006, **66**, 1267-1273.

PETIT, H.

La paratuberculose des petits ruminants : résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose
Le Point Vétérinaire, 2006, **263**, 46-50.

PETRIE, L.

Diagnostic différentiel de la diarrhée chez les bovins adultes.

Le Point Vétérinaire, 1991, **23(135)**, 69-77.

PICKUP, R.W., RHODES, G., ARNOTT, S. *et al.*

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the catchment area and water of the river Taff in south Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease case in the city of Cardiff.

Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**, 2130-2139.

PICKUP, R.W., RHODES, G., BULL, T.J. *et al.*

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works : diverse opportunities for environmental cycling and human exposure.

Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**, 4067-4077.

POUPART, P., COENE, M., VAN HEUVERSWY, H. *et al.*

Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnostic of Johne's disease.

Journal of Clinical Microbiology, 1993, **31**, 1601-1605.

REDDACLIFF, L. EPPLESTON, J., WINDSOR, P. *et al.*

Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks.

Veterinary microbiology, 2006, **115**, 77-90.

REDDACLIFF, L.A. et WHITTINGTON, R.J.

Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

Veterinary Microbiology, 2003a, **96**, 247-258.

REDDACLIFF, L.A., BEH, K., MC GREGOR, H. *et al.*

A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease.

Aust. Vet. J., 2005, **83**, 435-441.

REDDACLIFF, L.A., VADALI, A., WHITTINGTON, R.J.

The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolated from tissues and faeces.

Veterinary Microbiology, 2003b, **95**, 271-282.

REPIQUET, D.

Prévalence de la paratuberculose bovine en France.

Société Française de Buiatrie, Paris, 2001.

- REVIRIEGO, F.J., MORENO, M.A., DOMINGUEZ, L.
Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain.
Preventive Veterinary Medicine, 2000, **43**, 43-51.
- RIOUX, J., XAVIER, R.J., TAYLOR, K.D. *et al.*
Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis.
Nature Genetics, 2007, **39**, 596-604.
- ROBBE-AUSTERMAN, S., KRULL, A.C., STABEL, J.R.
Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis.
Journal of Veterinary Medicine, 2006, **53**, 213-217.
- ROBINO, P., NEBBIA, P., MENEQUZ, P.G. *et al.*
Survey of paratuberculosis in roe deer (*Capreolus capreolus*).
In : 7th International Colloquium on Paratuberculosis.
Bilbao, Spain, 2002.
- RODRIGUEZ-LAZARO, D., D'AGOSTINO, M., HERREWEGH, A. *et al.*
Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in water and milk.
International Journal of food microbiology, 2005, **101**, 93-104.
- SECHI, L.A., MARA, L., CAPPAL, P. *et al.*
Immunization with DNA vaccines encoding different mycobacterial antigens elicits a Th1 type immune response in lambs and protects against *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection.
Vaccine, 2006, **24**, 229-235.
- SECHI, L.A., MURA, M., TANDA, F. *et al.*
Identification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization.
Journal of Clinical Microbiology, 2001, **39**, 4514-4517.
- SEITZ, S.E., HEIDER, L.E., HEUSTON, W.D. *et al.*
Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*.
Journal of American Veterinary Medicine Association, 1989, **194**, 1423-1426.
- SHERMAN, D.M., BRAY, B., GAY, J.M. *et al.*
Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle.
American Journal of Veterinary Research, 1989, **50**, 525-530.
- STABEL, J.R. et GOFF, J.P.
Efficacy of immunologic assays for the detection of Johne's disease in dairy cows fed additional energy during the periparturient period.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2004, **16**, 412-420.

- STABEL, J.R. et WHITLOCK, R.H.
An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001, **79**, 69-81.
- STOLL, M. *et al.*
Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease.
Nature Genetics, 2004, **36**, 476-480.
- STORSET, A.K., BERG I. et DJONNE, B.
Evaluation of the gamma interferon test for the diagnosis of paratuberculosis in goats.
Veterinary immunology and immunopathology, 2005, **107**, 87-94.
- STORSET, A.K., HASVOLD, H.J., VALHEIM, M. *et al.*
Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001, **80**, 271-287.
- STREETER, R.N., HOFFSIS, G.F. et BECH-NIELSEN, S.
Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows.
American Journal of Veterinary Research, 1995, **56**, 1322-1324.
- STRICKLAND S.J., SCOTT, H.M., LIBAL, M.C. *et al.*
Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy cattle.
Journal of Dairy Science, 2005, **88**, 2432-2440.
- STROMMENGER, B., STEVENSON, K., et GERLACH, G.F.
Isolation and diagnostic potential of *Ismav2*, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
FEMS Microbiol Lett, 2001, **196**, 31-37.
- SWEENEY, R.W., UZONNA, J., WHITLOCK, R.H. *et al.*
Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* recovery in a short-term bovine experimental oral infection model.
Research in veterinary Science, 2006, **80**, 253-259.
- SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H. et ROSENBERGER, A.E.
Mycobacterium paratuberculosis isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease.
American Journal of Veterinary Research, 1992, **53**, 477-480.
- SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H., BUCKLEY, C.L. *et al.*
Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle.
Journal of Veterinary Diagnosis Investigation, 1995, **7**, 488-493.

- TASARA, T., HOELZLE, L.E. et STEPHAN, R.
Development and evaluation of a *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay.
International Journal of Food Microbiology, 2005, **104**, 279-287.
- TAYLOR, T.K., WILKS, C.R., McQUEEN, D.S.
Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease.
Veterinary Research, 1981, **109**, 532-533.
- THOREL, M.F. et DELCROIX, T.
La vaccination de la paratuberculose dans le monde.
Bulletin des GTV-Hors-série paratuberculose des ruminants, 2002, 91-94.
- VAN SCHAIK, S.J., SCHUKKEN, Y.H., CRAINICEANU, C. *et al.*
Prevalence estimates for paratuberculosis adjusted for test variability using Bayesian analysis.
Preventive Veterinary Medicine, 2003, **60**, 281-295.
- TORIBIO, J.A. et SERGEANT, E.
A comparison of methods to estimate the prevalence of ovine Johne's infection from pooled faecal samples.
Australian Veterinary Journal, **85-8**, 317-324.
- VAN SCHAIK, G., PRADENAS, M.J., MELLA, A.N. *et al.*
Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Preventive Veterinary Medicine, 2007, **82**, 159-165.
- VAN WEERING, H., VAN SCHAIK, G., VAN DER MEULEN, A. *et al.*
Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds.
Veterinary Microbiology, 2007, **125**, 49-58.
- VERNA, A.E., GARCIA-PARIENTE, C., MUNOZ, M. *et al.*
Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.
Zoonoses and Public Health, 2007, **54**, 243-252.
- VIALARD, J.
Epidémiologie de la paratuberculose.
Bulletin des GTV-Hors-série paratuberculose des ruminants, 2002, 6-11.
- WARD, M.P. et PEREZ, A.M.
Association between soil type and paratuberculosis in cattle herds.
American Journal of Veterinary Research, 2004, **65**, 10-14.

- WELLS, S.J. et WAGNER, B.A.
Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in UK dairies and association between familiarity of the herd manager with the diseases or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures.
Journal of American Veterinary Medicine Association, 2000, **216**, 1450-1457.
- WELLS, S.J., GODDEN, S.M., LINDEMAN, C.J. *et al.*
Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds.
Journal of American Veterinary Medicine Association, 2003, **223**, 1022-1025.
- WELLS, S.J., COLLINS, M.T., FAABERG, K.S. *et al.*
Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy cattle.
Clin. Vaccine Immunol., 2006
- WHAN L., GRANT, I.R., et ROWE, M.T.
Interaction between *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and environmental protozoa.
BMC Microbiology, 2006, **6**, 63-69.
- WHAN, L., GRANT, I.R., BALL, H.J. *et al.*
Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in drinking water.
Lett. Appl. Microbiol., 2001, **33**, 227-231.
- WHITTINGTON, R.J, LLOYD, R.J, et REDDA CLIFF, L.A.
Recovery of *Mycobacterium avium susp. paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease.
Veterinary Microbiology, 2001, **81**, 273-279.
- WHITTINGTON, R.J., MARSH, I.B. et REDDA CLIFF, L.A.
Survival of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dam water and sediment.
Applied and environmental microbiology, 2005, **71**, 5304-5308.
- WHITTINGTON, R.J., MARSH, I.B., TAYLOR, P.J. *et al.*
Isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis.
Australian veterinary Journal, 2003, **81**, 559-563.
- WHITTINGTON, R.J., MARSHALL, D.J., NICHOLLS, P.J. *et al.*
Survival and dormancy of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in the environment.
Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**, 2989-3004.
- WHITTINGTON, R.J., REDDA CLIFF, L.A., MARSH, I. *et al.*
Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in sheep with Johne's disease.
Australian Veterinary Journal, 2000, **78**, 34-37

WILLIAMS, E.S., SPRAKER, T.R. et SCHOONVELD, G.G.
Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado.
Journal of Wildlife Diseases, 1979, **15**, 221-227.

YAMASAKI, K. *et al.*
Single nucleotide polymorphisms in *TNFSF15* confer susceptibility to Crohn's disease.
Human Molecular Genetic, 2005, **14**, 3499-3506.

ZWICK, L.S., WALSH, T.F., BARBIERS, R. *et al.*
Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*).
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2002, **14**, 326-328.

Toulouse, 2008

NOM : CHASTEL

PRENOM : Michaël

TITRE : Epidémiologie de la paratuberculose des ruminants : conséquences sur les mesures de contrôle et de prévention.

RESUME :

Cette étude a analysé les répercussions pratiques des caractéristiques épidémiologiques de la paratuberculose chez les ruminants, et les caractéristiques des méthodes analytiques disponibles pour le contrôle et la prévention de cette maladie, plus particulièrement dans l'espèce bovine. L'auteur y présente tout d'abord les éléments épidémiologiques majeurs, aussi bien descriptifs qu'analytiques de l'agent pathogène responsable, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, illustrés par des exemples pratiques. Puis les différentes méthodes de diagnostic et de dépistage sont décrites, en évaluant pour chacune les applications possibles, ainsi que les caractéristiques analytiques. La troisième partie est une analyse des mesures de lutte et de prévention contre la maladie, appliquée au cas particulier de l'élevage bovin en France, à la lumière des données épidémiologiques, et des méthodes analytiques disponibles.

MOTS-CLES : Paratuberculose, bovin, épidémiologie, prévention, ruminant, assainissement.

TITLE : Ruminant paratuberculosis epidemiology : consequences on prevention and control measures.

ABSTRACT :

This study explores the practical consequences of the epidemiologic characteristics of paratuberculosis in ruminants and the analytical methods available for prevention and control of this disease, especially in cattle. The author describes the major epidemiologic components, as much descriptive as analytic, of the pathogen *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, and provides examples of practical applications of this knowledge. Different methods of laboratory assessment and detection are then presented, and qualities and possible applications are evaluated for each of them. Finally, the third part consists in the analysis of prevention, and fight against paratuberculosis in the cattle industry in France is discussed, in the light of epidemiologic data and analytical methods available.

KEY WORDS : Paratuberculosis, cattle, epidemiology, prevention, ruminant,