



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

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25497

To cite this version:

Tropée, Alliaume  and Prévot, Camille . *PCR quantitative appliquée à des mélanges de fèces pour le diagnostic de la paratuberculose caprine : comparaison de deux méthodes de préparation des échantillons*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 94 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

PCR QUANTITATIVE APPLIQUEE A DES MELANGES DE FECES POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE CAPRINE : COMPARAISON DE DEUX METHODES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

TROPEE Alliaume Né, le 16/04/1994 à RENNES (35)
PREVOT Camille Née, le 03/01/1992 à LYON (69)

Directeur de thèse : M. Fabien CORBIERE

JURY

PRESIDENT :
M. Éric OSWALD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Fabien CORBIERE
M. Gilles FOUCRAS

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

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- Mme **BORDE DORE Laura**, *Médecine interne des équidés*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre jury de thèse :

A Monsieur le Professeur Eric Oswald

Professeur d'Université - Praticien Hospitalier

Pathogénie et commensalisme des Entérobactéries

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

Hommages respectueux

A Monsieur le Docteur Fabien Corbière

Maitre de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Pour nous avoir confié à tous deux ce sujet de thèse, ainsi que pour son encadrement et ses conseils tout au long du travail réalisé,

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Gilles Foucras

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury, et pour son assistance précieuse durant ce travail,

Sincères remerciements

Table des matières

Introduction	13
Partie I : Etude bibliographique.....	15
I. Le contexte épidémiologique	15
I.1. Situation géographique	15
I.2. Modalités de transmission.....	16
I.3. Répercussions liées à la paratuberculose	17
II. L'agent étiologique : <i>Mycobacterium avium</i> spp. <i>paratuberculosis</i>	18
II.1. Classification et caractéristiques	18
II.2. Variabilité.....	19
II.3. Milieu de vie et résistance	19
III. De la bactérie à la maladie.....	21
III.1. Espèces sensibles.....	21
III.2. Physiopathologie	22
III.2.1. Dose infectieuse	22
III.2.2. Mécanisme de résistance dans le phagosome	23
III.2.3. Profil de la réponse immunitaire induite.....	24
III.2.4. Excrétion fécale.....	25
III.3. Expressions cliniques	27
III.3.1. Formes lésionnelles.....	27
III.3.2. Formes cliniques	29
IV. Les méthodes de diagnostic, de contrôle et de lutte	31
IV.1. Dépistage de la paratuberculose.....	31
IV.1.1. Les méthodes directes	31
IV.1.2. Les méthodes indirectes	33
IV.1.3. Analyse de mélanges d'échantillons	35

IV.2.	Mesures de maîtrise et de prévention	39
IV.2.1.	Prévention de l'introduction dans les élevages sains	39
IV.2.2.	Maîtrise sanitaire au sein des élevages infectés	41
IV.2.3.	Plans de lutte contre la paratuberculose	43
IV.2.4.	Vaccination	45
IV.2.5.	Traitement curatif.....	46
IV.2.6.	L'option de la sélection génétique	46
Partie II :	Etude expérimentale	49
I.	Contexte et objectif de l'étude	49
II.	Matériel et méthodes	50
II.1.	Obtention des échantillons	50
II.1.1.	Sélection des élevages	51
II.1.2.	Sélection des animaux	51
II.1.3.	Sélection des échantillons positifs.....	52
II.1.4.	Echantillons négatifs.....	52
II.2.	Protocole.....	52
II.2.1.	Préparation des échantillons individuels	53
II.2.2.	Réalisation des mélanges.....	53
II.2.3.	Extraction.....	55
II.2.4.	Amplification.....	56
II.2.5.	Réalisation de gammes de dilution.....	56
II.3.	Obtention des résultats	58
III.	Résultats.....	59
III.1.	Gammes.....	59
III.2.	Evaluation de la présence d'inhibiteurs d'amplification dans les fèces.....	61
III.3.	Analyses des échantillons individuels.....	62
III.4.	Comparaisons des deux méthodes de préparation des échantillons.....	66

III.5. Sensibilité de détection sur des mélanges en phase liquide	67
IV. Discussion.....	70
Conclusion.....	76
Bibliographie :.....	79
Annexe 1: Protocole d'extraction / purification.....	92

Table des illustrations

Figures :

Figure 1: Carte de distribution de la paratuberculose à l'échelle mondiale (Source : OIE, 2018)	15
Figure 2: Protocole de constitution des mélanges en phase liquide.....	55
Figure 3: Courbes de répliation obtenues par LightCycler 96.....	58
Figure 4: Régression linéaire de $C_q=f(\text{Log}(\text{IS900}))$ (gauche) et $C_t=f(\text{Log}(\text{IS900}))$ (droite).....	60
Figure 5: Représentation graphique des échantillons positifs sous LC96.....	62
Figure 6: Corrélation entre les C_q (LC96) et les C_t (R).....	63
Figure 7: Distribution des échantillons en fonction du C_q	64
Figure 8: Répartition des individus testés selon l'élevage et le niveau d'excrétion.....	65
Figure 9: Comparaison des résultats de quantification individuelle et en mélange	69

Tableaux :

Tableau 1: Valeurs D et Valeurs Z de souches Map en suspension dans le lait (Sung et Collins 1998).....	20
Tableau 2: Classification des lésions digestives de paratuberculose (Pérez, García Marín, et Badiola 1996)	28
Tableau 3: Sensibilité analytique de la culture sur mélange de fèces en fonction de la taille des mélanges et de la forme lésionnelle observée (d'après Dhand et al. 2010).....	37
Tableau 4: Récapitulatif des caractéristiques des tests de dépistage de la paratuberculose.....	38
Tableau 5: Principales caractéristiques de plans de lutte nationaux.	44
Tableau 6 : Description des classes d'âge, d'après Dr. Vet. Joye (2016, thèse d'exercice vétérinaire)	51

Tableau 7: correspondance entre les points de gamme et la quantité de copies IS900.....	57
Tableau 8: Cycles seuils obtenus selon les gammes	59
Tableau 9: Résumé des calculs sur les Cq obtenus après amplification	61
Tableau 10: Comparaison des méthodes de mélange, en Cq (calcul LC96, en haut) ou en Ct (calcul package qPCR, en bas).....	66
Tableau 11: Résultats des analyses qPCR sur les mélanges de fèces en phase liquide	67
Tableau 12: Variabilité des résultats de qPCR sur mélanges liquides réalisés en duplicatas ..	68
Tableau 13: Confrontation entre les sensibilités prédites et observées	72

Table des abréviations :

ACERSA : Association pour la certification en santé animale

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BAAR : Bacille Acido-Alcool-Résistant

DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations

DIVA : Differentiating Infected from Vaccinated Animals

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GDS : Groupement de Défense Sanitaire

GMQ : Gain Moyen Quotidien

IFN-gamma : Interféron gamma

Map : *Mycobacterium avium spp. paratuberculosis*

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

TFN-alpha : Tumor Necrosis Factor -alpha

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

La paratuberculose, aussi appelée "Maladie de Johne" du nom du vétérinaire l'ayant identifiée en 1894, est une maladie enzootique contagieuse, dont l'agent étiologique est une mycobactérie : *Mycobacterium avium spp. paratuberculosis* (Map). Présente dans de nombreux pays, elle touche aussi bien les ruminants domestiques que sauvages. L'infection se traduit par une entérite granulomateuse chronique, conduisant à l'apparition tardive de la forme clinique (1 à 10 ans après infection). Les symptômes observés sont alors souvent très frustes et caractérisés essentiellement par un amaigrissement progressif, une chute de production, et dans certaines espèces, dont les bovins, une diarrhée cachectisante. Ainsi, le diagnostic clinique est très tardif et difficile, ce qui rend indispensable le recours aux examens de laboratoire pour l'identification des animaux infectés.

De nombreux tests de dépistage existent pour la paratuberculose, mais leur interprétation est rendue difficile par plusieurs facteurs. Le résultat des méthodes diagnostiques "directes", cherchant à mettre en évidence l'agent pathogène, (culture, PCR, bactérioscopie), est dépendant de la quantité de bactéries présentes dans le milieu analysé (matières fécales, lait) Or, après infection, l'excrétion fécale de Map est très variable au cours du temps, en particulier avant la déclaration de la phase clinique, pouvant conduire à de faux négatifs. Les méthodes diagnostiques dites indirectes s'intéressent aux répercussions de la présence de la bactérie dans l'organisme et ciblent notamment la réaction immunitaire induite. Là encore, ces approches ne sont pas sans difficultés puisque la réponse immunitaire à Map, qu'elle soit cellulaire ou humorale, varie selon le stade infectieux, conduisant à un certain degré d'incertitude et à des résultats faussement négatifs vis-à-vis de l'infection.

Les performances diagnostiques de la PCR sur fèces, même si elles ne sont pas optimales, principalement en terme de sensibilité, en font tout de même un outil intéressant dans le diagnostic du statut d'un troupeau. Cependant, le coût élevé de cette technique limite son utilisation à l'échelle individuelle sur le terrain, du fait, d'une part, de la faible valeur économique individuelle des petits ruminants et, d'autre part, de la grande taille des troupeaux ovins et caprins. L'une des solutions à ce problème pourrait être la réalisation d'analyses de mélanges d'échantillons de fèces, comme cela est déjà le cas pour de nombreuses pathologies.

L'objectif principal du travail ici présenté était de comparer deux méthodes de préparation des mélanges d'échantillons de fèces avant leurs analyses par PCR quantitative (qPCR). Les objectifs secondaires étaient par ailleurs d'évaluer la sensibilité analytique de la qPCR selon la taille et la composition des mélanges de fèces et d'évaluer l'influence potentielle d'inhibiteurs de PCR sur les résultats.

La première partie du présent rapport est consacrée à une revue bibliographique rapide des connaissances sur la paratuberculose. La seconde partie est quant à elle dédiée aux matériels et méthodes employés dans notre étude, ainsi qu'aux principaux résultats, leur interprétation et leur discussion.

Partie I : Etude bibliographique.

Avant toute étude expérimentale, une revue des connaissances actuelles sur la paratuberculose est nécessaire et donne tout son sens à cette première partie. Des données générales y seront exposées, permettant de mettre en lumière l'agent infectieux responsable de cette affection, ainsi que les moyens diagnostiques, de contrôle et de lutte existants.

I. Le contexte épidémiologique

I.1. Situation géographique

La paratuberculose a été signalée sur tous les continents depuis sa description. Sa répartition sur le globe peut être appréciée par le biais de l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale), et par son interface WAHIS (système mondial d'informations zoosanitaires). La carte de répartition mondiale, datée de 2018, est présentée Figure 1. Cependant, l'absence d'homogénéisation des protocoles de surveillance et de dépistage entre les différents pays, le manque d'enquêtes à grande échelle, ainsi que le caractère discret de la maladie font que son importance mondiale est probablement sous-estimée. Les principales estimations disponibles font état de prévalences, dans les cheptels bovins, allant de 20 à 50% des élevages laitiers aux Etats-Unis, Canada, Australie et en Europe, sans pouvoir exclure la présence de la maladie dans un seul autre pays (S. J. Wells et Wagner 2000).

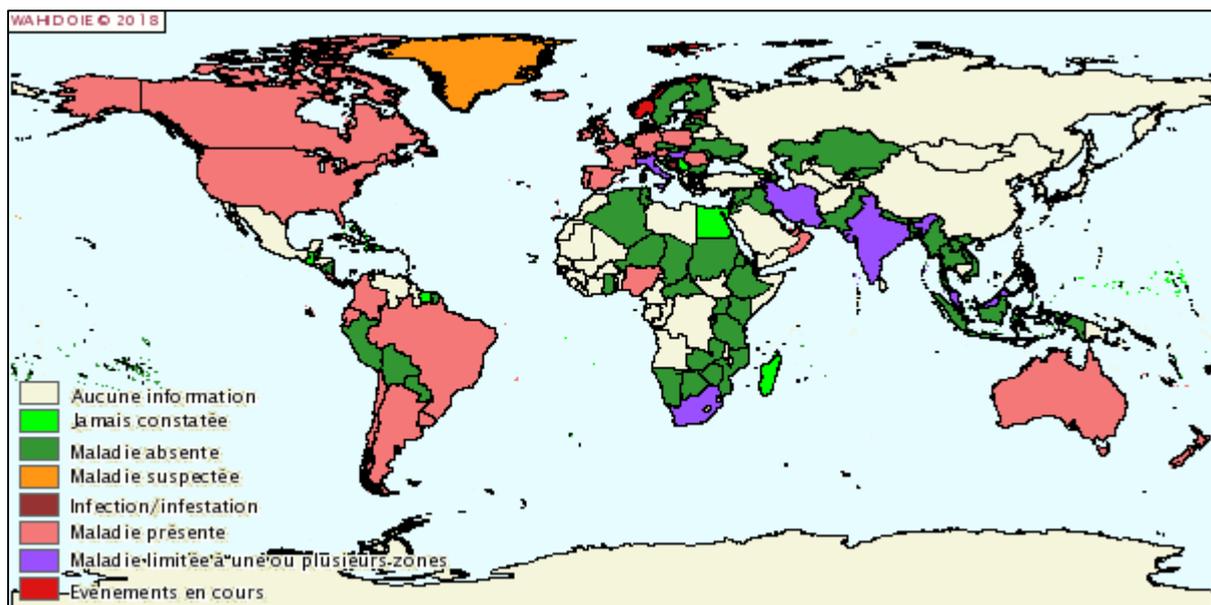


Figure 1: Carte de distribution de la paratuberculose à l'échelle mondiale (Source : OIE, 2018)

Contrairement à la tuberculose à *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium tuberculosis*, la paratuberculose associée à *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Map) n'est classée ni dans la liste des Maladies à Déclaration Obligatoire, ni dans celle des Maladies Réputées Contagieuses, ce qui complique le recueil de données concernant sa répartition nationale. Les informations disponibles permettent cependant de considérer la maladie comme ubiquiste, même si sa prévalence estimée varie fortement selon les régions. La sensibilité variable des acteurs locaux (vétérinaires, GDS, éleveurs) biaise les chiffres de prévalence obtenus sur le territoire français. Cependant, la tendance semble être à une plus grande prévalence au sein des troupeaux laitiers par rapport aux troupeaux allaitants, ainsi qu'en Bretagne, Normandie et Massif central. Une étude menée sur 105 élevages caprins français par sérologie ELISA en 2010 estime la prévalence nationale à 63% des troupeaux et 6,6% des individus, et la prévalence intra élevages positifs à 11% (Mercier et al. 2010).

I.2. Modalités de transmission

La paratuberculose est une maladie contagieuse dont la transmission peut être réalisée de plusieurs façons. Une contamination verticale est possible, avec transmission de la bactérie de la mère à sa progéniture. Plusieurs études portant sur la contamination intra-utérine chez les ruminants ont été réalisées, mettant en évidence des risques de transmission verticale chez quelques espèces. Une étude impliquant 106 mères et leurs 119 agneaux d'un troupeau fortement infecté (20% de mortalité annuelle due à la maladie) estime la contamination verticale à 5% des agneaux en moyenne sur le troupeau (Lambeth et al. 2004). Cependant, les brebis en phase subclinique ne présentaient que 1,9% d'agneaux infectés, contre 83% pour les brebis en phase clinique (Lambeth et al. 2004). Une méta-analyse de la transmission intra-utérine chez les bovins permet d'estimer la proportion de veaux infectés annuellement par voie verticale à environ 1% pour les troupeaux à faible prévalence d'infection (5%), et 7% pour ceux à forte prévalence d'infection (40%), avec de nouveau une forte variation entre les mères en phase clinique (39% des veaux) et celles en phase subclinique (9%) (Richard J. Whittington et Windsor 2009). D'autres études encore laissent suspecter un fort taux de transmission verticale chez les biches élaphe (Thompson, Clark, et Mackintosh 2007), y compris celles en phase subclinique, et un risque présent chez les buffles (As et al. 2016). L'excrétion de Map dans le lait et le colostrum a été démontrée chez les bovins, caprins, ovins, mais aussi les cerfs élaphe, ce qui rend une contamination dite « pseudo-verticale » tout à fait envisageable, mais corrélée au statut clinique ou subclinique de la mère/nourrice.

La contamination par voie horizontale se produit à travers l'environnement contaminé par les fèces d'animaux excréteurs, et dans une moindre mesure leur lait. L'eau, le logement, la mamelle et le matériel de traite peuvent être souillés et servir de réservoirs exogènes sur des périodes allant jusqu'à plusieurs mois (Grewal et al. 2006).

En effet, les fèces représentent la principale voie d'excrétion de Map chez les animaux infectés, et la contamination de l'environnement qui en découle peut perdurer sur de longues périodes. De plus, l'excrétion fécale est souvent inconstante et peut même résulter d'un portage passif. Le niveau de contamination des fèces apparaît comme étant corrélé à la progression de la maladie. Le lait et le colostrum sont aussi identifiés chez les bovins, ovins et caprins comme une voie d'excrétion de Map dans l'environnement, mais dans une moindre mesure que les fèces. De plus, il est apparu que la semence de taureaux et de béliers portait la trace d'une excrétion de Map chez des individus atteints de paratuberculose (Khol et al. 2010, Eppleston et Whittington 2001).

Les facteurs de risque d'introduction et de propagation de la paratuberculose dans un élevage sont multiples et découlent du caractère discret et chronique de la maladie. L'introduction dans un élevage se fait essentiellement par l'achat d'animaux infectés asymptomatiques, mais le rôle des réservoirs sauvages, même s'il semble minoritaire, est aussi à prendre en considération.

Etant donné le risque de transmission pseudo-verticale, horizontale, et la sensibilité des jeunes, le contact prolongé avec les mères et les mélanges de jeunes de statuts variables ou inconnus est associé à un risque accru d'infection plus fréquente. De plus, l'importance de l'excrétion fécale et la survie de Map dans l'environnement favorisent la propagation de la maladie dans les élevages en cas de mauvaise gestion des déjections, de la litière, de l'eau de boisson et de l'alimentation d'une part, et de la désinfection des locaux et du matériel d'autre part.

I.3. Répercussions liées à la paratuberculose

D'un point de vue clinique, la paratuberculose se traduit essentiellement par une baisse de l'état général, un amaigrissement progressif allant jusqu'à la mort sur une période de plusieurs mois à plusieurs années. Le manque à gagner pour l'élevage est donc chronique et difficilement évaluable avec précision, mais sera lié à différents paramètres : baisse de la valeur bouchère, baisse de production laitière, diminution des résultats de reproduction et de la durée de la

carrière productive des animaux atteints. La paratuberculose représente aussi un coût pour les élevages infectés mettant en place des outils de diagnostic et de contrôle de la maladie.

Au-delà de son impact économique, la présence de Map dans les élevages pourrait potentiellement présenter un risque sanitaire, non seulement pour les éleveurs, mais aussi pour les consommateurs des produits de ces élevages. En effet, il est suspecté depuis près d'un siècle que *M. avium spp paratuberculosis* participe à l'étiologie de la maladie de Crohn du fait de la similarité des deux affections. Aucun lien de causalité stricte n'est cependant établi, mais l'Homme est facilement exposé à des Map d'origine animale (résistance dans l'environnement, l'eau et le lait contaminés) et celles-ci sont retrouvées chez plus de 50 % des patients (Rodrick J. Chiodini et al. 2012). De plus, une corrélation a été observée entre l'incidence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et celle de la maladie de Johne (Hermon-Taylor 2009). Le portage de Map est donc en général considéré à minima comme un facteur de risque pour la maladie de Crohn.

II. L'agent étiologique : *Mycobacterium avium spp. paratuberculosis*

II.1. Classification et caractéristiques

La paratuberculose est une affection bactérienne dont l'agent infectieux est un bacille : *Mycobacterium avium spp. paratuberculosis* (Map). Ce dernier appartient à l'embranchement des actinobactéries : c'est une eubactérie classée Gram positive et qui possède donc une structure, comprenant notamment une membrane externe, offrant une plus grande résistance à de nombreux agents extérieurs. De plus, appartenant au genre des mycobactéries, elle est caractérisée par un métabolisme aérobie et une paroi riche en acide mycolique. Cette paroi possède ainsi la particularité d'être imperméable à l'alcool, la classant comme un bacille acido-alcool-résistant (BAAR). Sur ce principe, les mycobactéries sont mises en évidence par la coloration de Ziehl-Neelsen, qui consiste à réaliser une étape de décoloration à l'acide et à l'alcool entre deux colorations distinctes à la fushine et au bleu de méthylène. Le genre *Mycobacterium* regroupe cependant un grand nombre d'espèces parmi lesquelles sont retrouvés les agents de la tuberculose : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*.

II.2. Variabilité

Plusieurs souches ont été identifiées comme appartenant à la sous-espèce *Map*, notamment deux souches principales : les souches C (pour "Cattle", isolées sur des bovins domestiques) et S (pour "Sheep", isolées sur des ovins domestiques). Cependant, il apparaîtrait que des contaminations croisées soient possibles entre ovins et bovins pour chacune des deux souches, même si les profils d'infection semblent différer selon la souche. Une troisième souche a été identifiée, nommée souche B chez des ruminants sauvages (bisons) présentant des signes cliniques de paratuberculose (Windsor 2015).

II.3. Milieu de vie et résistance

Mycobacterium avium spp. *paratuberculosis* est en mesure de résister à un intervalle de température très large. En effet, elle est capable de survivre trois mois à -70°C (Khare et al. 2008). En ce qui concerne les hautes températures, plusieurs études ont été réalisées notamment dans un contexte de gestion de denrées alimentaires. *In vitro*, une suspension de *Map* à 10^6 cellules/ml ne pourrait pas survivre plus d'une minute dans un milieu dont la température est supérieure ou égale à 70°C (35 secondes à 70°C , 30 secondes à 80°C). En comparaison, il faudrait près de trente minutes pour inactiver cette même suspension à 60°C (Gumber et Whittington 2009). D'autres études font état de l'effet de la pasteurisation sur les colonies de *Map* dans le lait. Une suspension de 10^4 cellules/ml de lait garde une viabilité de 10% suite à un traitement à 63°C pendant 30 minutes (Chiodini et Hermon-Taylor 1993).

Dans le domaine de la sécurité alimentaire, des variables sont standardisées : D correspondant au temps de réduction décimal, c'est-à-dire la durée d'application d'une température donnée pour diviser la population bactérienne étudiée par dix ; Z est l'augmentation de température nécessaire pour diviser cette valeur par dix. Ces paramètres ont notamment été évalués pour *Map*, dans le lait, par Sung et Collins (1998) et sont répertoriées Tableau 1.

Les données obtenues nous indiquent qu'une pasteurisation haute température-temps court du lait peut se révéler insuffisante pour stériliser le lait vis-à-vis de *Map*, si la contamination par celle-ci est supérieure à 10^1 germe/ml (Grant et al. 2017; Leão et al. 2017; Gerrard et al. 2018). Cette méthode de pasteurisation (72 à 85°C , 5 à 20 secondes) étant la plus utilisée, au détriment de la méthode basse température-temps long (64°C , 30 minutes), cela pose des questions

sanitaires tant en ce qui concerne l'abreuvement des jeunes veaux au lait pasteurisé qu'en ce qui concerne la consommation humaine de ce produit.

Tableau 1: Valeurs D et Valeurs Z de souches Map en suspension dans le lait (Sung et Collins 1998)

Souche	Valeur D (s) à :				Valeur Z (°C)
	62°C	65 °C	68°C	71 °C	
ATCC 19698	119,9	70,6	22,8	16,5	9,76
BO45	308,9	47,7	21,7	11,7	6,51
Dominic	162,5	38,9	20,2	12,3	8,24
Ben	209,9	40,9	14,6	9,8	6,94
En commun	228,8	47,8	21,8	11,6	7,11

Dans l'environnement extérieur, des variations quotidiennes de température entre 8 et 50°C semblent avoir un impact sur Map et induire une dormance de celle-ci (Richard J. Whittington et al. 2004).

La température n'est cependant pas le seul facteur à prendre en compte dans le milieu de vie d'une bactérie. D'autres paramètres montrent un véritable intérêt, tel que le pH ou l'humidité.

La croissance de Map a été observée pour des pH variant de 5,4 à 7, avec un optimum en dessous de 6,6. De plus, il apparaît que la viabilité de Map n'est que peu influencée au-delà d'un pH de 4. Map a pu être identifiée dans le lait d'animaux infectés, et dans le fumier d'élevages contaminés, du fait d'une excrétion dans les fèces, le lait et le colostrum. Il a été observé que si la croissance et la multiplication de Map sont interrompues lors d'une exposition à un pH bas (<4), la réduction de population viable de Map lors d'une exposition durant 12 jours à un milieu contenant 5% d'acide lactique et de pH 3 est inférieure à deux log décimaux (Kralik et al. 2018).

Pour ce qui est de l'humidité, cette bactérie semble adaptée au milieu aqueux, expliquant les risques de contamination de l'eau de boisson. En effet, Map pourrait survivre entre deux et trois mois dans une eau conservée entre 9 et 26°C (Whittington et al. 2005). De plus, sa survie est favorisée par la formation de biofilm, notamment observée dans des abreuvoirs en béton ou acier galvanisé en élevage (Cook et al. 2010).

Kralik et al. (2018), ont testé la viabilité de Map après une exposition répétée à différents agents, dont les ultraviolets. Ces derniers ne conduisent qu'à une réduction partielle de la viabilité de Map, et non totale comme pour d'autres agents (Kralik et al. 2018). Par exemple ils ont démontré une forte efficacité de l'acide per-acétique dans la destruction de Map, y compris à de basses concentrations (0,5%) ou lors d'expositions répétées à une concentration plus faible (0,05%), confirmant la sensibilité des mycobactéries à ces agents. Moravkova et al (2012) ont étudié l'utilisation d'ammonium à 4% dans la désinfection d'un élevage bovin à forte prévalence de paratuberculose, après abattage du troupeau. Ces mesures de désinfection n'ont pas permis l'éradication de Map dans les étables des adultes et des veaux, en prenant en compte les instruments, les mangeoires et abreuvoirs, le sol et les toiles d'araignées, avec persistance de Map au moins 24 mois après traitement, sans réintroduction d'animaux (Moravkova et al. 2012). Cette même étude a permis d'évaluer les effets du chlore sur la survie de Map, et a mis en évidence une inactivation incomplète de Map lors d'une exposition à 2mg/L pendant 30 minutes, ce qui implique une viabilité de l'organisme dans le biofilm des systèmes de distribution d'eau. En effet, les normes sanitaires françaises révisées en 2003 imposent des concentrations en chlore, sur tout le réseau d'eau potable, 20 à 40 fois inférieures à cette valeur, dans le cas de risque sanitaire inhabituel (« Bulletin Officiel n°2003-48 » 2018).

Enfin, les mycobactéries sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques du fait de leur épaisse membrane lipidique. En tant que mycobactérie atypique, ou non-tuberculeuse, Map présente des caractéristiques encore différentes des mycobactéries comme *M. tuberculosis*, notamment en termes de résistance à certains des antibiotiques dits antituberculeux comme la dapsonne, mais pas à d'autres comme la rifabutine, la rifampicine ou la streptomycine (Zanetti et al. 2006). De plus, des macrolides comme la clarythromycine ont été utilisés avec succès dans le traitement de la maladie de Crohn en présence de Map (Alcedo, Thanigachalam, et Naser 2016).

III. De la bactérie à la maladie

III.1. Espèces sensibles

L'infection par *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* n'a pas les mêmes répercussions selon les espèces impliquées. En effet, chez les ruminants, elle peut être à l'origine de signes cliniques, dont la nature est variable (Cf chapitre III.3.2). Les individus touchés sont

principalement d'espèces domestiques : bovins, ovins, et caprins, de races laitières ou allaitantes, mais des cas ont aussi été décrits chez les cervidés d'élevage. Cependant, les espèces sauvages sont aussi sensibles, la paratuberculose ayant été recensée chez des cerfs, chevreuils, bisons et élans (Williams et al. 1983). Chez ces derniers, les symptômes associés étaient comparables à ceux des espèces domestiques. Toutefois, Map a été identifiée chez de nombreuses autres espèces sans que son caractère pathogène soit clairement défini. C'est le cas notamment des primates, rongeurs, léporidés et oiseaux, qui de ce fait peuvent de façon théorique présenter un caractère contaminant pour les ruminants. A ce jour, seuls les ruminants domestiques, les cervidés sauvages et le lapin sauvage (*Oryctolagus cuniculus*) sont considérés comme des espèces réservoirs en France et en Europe (Shaughnessy et al. 2013).

III.2. Physiopathologie

L'initiation de l'infection par Map se fait très majoritairement par voie orale à la faveur d'une contamination oro-fécale, via l'environnement, l'eau ou l'aliment, souillés par les matières fécales d'individus excréteurs. D'autres voies ont toutefois été identifiées chez les jeunes : une contamination lors de la tétée est possible, en raison d'une mamelle souillée ou en cas d'excrétion de Map dans le colostrum/lait mais aussi une transmission intra-utérine chez les ruminants domestiques. De plus, la possibilité pour les mycobactéries d'être transportées viables après aérosolisation d'un liquide contaminé a été documentée lors de l'étude de troubles respiratoires chez l'Homme (Falkinham 2003) et lors d'études expérimentales chez les bovins (Eisenberg et al. 2010; Eisenberg, Nielen et al. 2011; Eisenberg, P. Koets et al. 2011).

Après ingestion, les bacilles de Johne vont rejoindre la muqueuse digestive et pouvoir s'étendre à l'intestin grêle et les nœuds lymphatiques mésentériques associés. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une quantité de Map suffisante pour pouvoir infecter et coloniser l'hôte.

III.2.1. Dose infectieuse

De nombreuses études ont été conduites pour estimer la dose infectieuse requise permettant d'atteindre l'expression clinique de la maladie. L'une d'elles, menée sur des brebis et des agneaux, a permis de comparer des groupes exposés à deux doses expérimentales différentes (4.10^6 et 2.10^2 UFC/ml). Les résultats indiquent que seule la dose la plus forte conduit à des lésions intestinales à 115 et 215 jours post-infection, chez les jeunes comme chez les adultes,

mais avec des expressions lésionnelles différentes (Delgado et al. 2013). Une autre étude, menée sur des bovins, a réussi à détecter des lésions microscopiques intestinales liées à la paratuberculose pour des doses infectieuses strictement supérieures à $1,5 \times 10^6$ UFC/ml (Mortier et al. 2015).

La principale porte d'entrée se trouve au niveau des plaques de Peyer intestinales, via la captation de Map par les cellules M et après opsonisation par la fibronectine. S'ensuit une prise en charge par les macrophages résidents, à l'origine de la phagocytose des mycobactéries. Cependant, des formes viables des bacilles sont capables de résister en modifiant le fonctionnement du phagolysosome.

III.2.2. Mécanisme de résistance dans le phagosome

Map est capable de retarder l'acidification et la maturation du phagosome, permettant sa survie jusqu'à 24 heures après phagocytose. En effet, le pH des phagosomes contenant des Map viables n'est abaissé qu'à 6,3 en 72h, comparé à un pH attendu de 5,2 pour les phagosomes témoins (Kuehnel et al. 2001). De plus, il a été mis en évidence une réduction du taux de fusion entre les phagosomes contenant des Map viables et le lysosome.

D'autres hypothèses ont été formulées quant aux mécanismes permettant une meilleure viabilité de Map dans les macrophages de l'hôte. Elles concernent essentiellement les dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote, dont le caractère mycobactéricide a été identifié. Ces hypothèses sont étayées par des résultats favorables dans les lignées de macrophages de référence : J774 (Arsenault et al. 2014). Cependant, ces lignées cellulaires sont issues de la souris, et des différences ont été notées avec les macrophages du bétail et notamment des bovins, particulièrement en ce qui concerne leur réponse aux IFN-gamma et TNF-alpha en termes de production de ROI (Reactive Oxygene Intermediate) et RNI (Reactive Oxygene Intermediate) (Lam et al. 2009).

Les macrophages infectés, en attirant lymphocytes et fibroblastes, sont à l'origine de la formation de granulomes, lésions élémentaires typiques de la paratuberculose (Abendaño et al. 2014). L'ensemble de ce processus se déroule dans les premières heures après le contact avec Map.

Après quelques jours à quelques semaines de multiplication au sein du phagosome, Map va conduire à l'apoptose des macrophages, libérant une quantité plus importante de bacilles. Ces derniers peuvent alors être excrétés dans la lumière intestinale pour *in fine* contaminer l'environnement, ou être phagocytés de nouveau par des macrophages circulants. Dans ce dernier cas, les macrophages peuvent soit conduire à la formation de nouvelles lésions dans la muqueuse de l'intestin grêle, soit participer à la dissémination des bactéries par les voies lymphatique et sanguine, conduisant à la colonisation des nœuds lymphatiques, d'autres organes comme le foie, mais aussi du lait et de la semence.

La réaction immunitaire de l'organisme joue un rôle important dans l'infection par Map qui utilise la réponse cellulaire, via les macrophages pour se développer. Cependant, la réalité est plus complexe et comprend aussi une réponse humorale. Le profil ainsi obtenu ne sera alors pas toujours favorable au développement de Map.

III.2.3. Profil de la réponse immunitaire induite

Le profil de la réponse immunitaire faisant suite à la contamination de l'organisme par Map a été largement étudié lors de recherches cliniques, en fonction du stade clinique et lésionnel des individus. Les premières conclusions tirées de ces études ont mené à la mise en place d'un modèle « classique » (Chiodini et al.1984). Ce modèle décrit une réponse initiale à médiation cellulaire (Th1), initiée par la phagocytose des bacilles par les macrophages et conduisant à la mobilisation de différents agents et à la production d'interférons gamma. Ce processus serait par la suite dévié vers une réponse majoritairement humorale (présence d'anticorps) dite Th2. Cette analyse propose une vision binaire de l'immunité, or, par la suite, les travaux de Beggs et de son équipe ont permis de démontrer que ce modèle n'était pas adapté et ne décrivait pas le fonctionnement immunitaire réel (Begg et al. 2011). Dans cette étude publiée en 2011, seuls 39% des ovins infectés (17 sur 44) présentaient un profil semblable au modèle précurseur, tandis que 50% présentaient une réponse humorale et cellulaire conjointes. Cette différence peut être attribuée notamment à l'évolution des méthodes de dépistage mises en œuvre.

En effet, le modèle classique se base sur l'absence de mise en évidence d'anticorps dirigés contre Map par test de fixation du complément ou AGID¹ (Agar Gel Immunodiffusion) chez les animaux infectés en phase subclinique. La méthode de détection par sérologie ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a permis d'augmenter la sensibilité et la spécificité de cette recherche d'anticorps.

La même année, une étude a permis de mettre en relation le type d'infection et le profil pathologique chez les ovins (Gillan et al. 2010). Celle-ci se base sur une classification de la maladie en trois types : paucibacillaire, multibacillaire et asymptomatique. La forme paucibacillaire est la plus précoce et présenterait des réponses cellulaires et humorales concomitantes, avec une forte production d'IFN-gamma et d'anticorps anti-Map ainsi qu'une activation aussi bien des lymphocytes B que des CD8+ et CD25+. La forme multibacillaire est caractérisée par une réponse immunitaire humorale très forte, avec une réponse cellulaire non seulement presque inexistante mais aussi non stimulable, ce qui a été confirmé par Beggs et al. (2011). Les individus infectés asymptomatiques présentent un profil immunitaire similaire à celui des individus sains, à ceci près que, lorsqu'ils sont exposés à Map, on observe une forte stimulation des lymphocytes CD4+. Ces lymphocytes CD4+ n'étant que peu (forme paucibacillaire) voire pas (forme multibacillaire) présents dans les autres profils, l'hypothèse d'un rôle important de ces lymphocytes dans la régulation de l'infection par Map est mise en avant par les auteurs.

Suite à l'infection et à la multiplication de Map dans les macrophages, les bacilles vont pouvoir être libérés dans la lumière digestive pour être excrétés dans les fèces. Leur survie dans le milieu extérieur sera alors déterminant pour pouvoir infecter un nouvel individu.

III.2.4. Excrétion fécale

L'excrétion fécale de Map par les individus infectés varie fortement au cours du temps, pour toutes les espèces considérées, et ce à plusieurs échelles. D'une part, l'excrétion dépend du stade clinique de la maladie et du temps écoulé depuis l'infection : pendant 2 mois à 2 ans après

¹ La technique d'immunodiffusion sur Gel consiste à réaliser deux puits dans une gélose où seront introduits de façon séparée le sérum à tester et les antigènes d'intérêt. Les anticorps pouvant migrer dans la gélose, si un sérum en contient, des complexes immuns vont se former et seront à l'origine d'une opalescence sur la gélose entre les deux puits testés.

l'infection, il n'y a pas d'excrétion de Map, ou à des niveaux non détectables (Stewart et al. 2004). En phase subclinique, ou pour les individus excréteurs asymptomatiques, l'excrétion varie d'un individu à l'autre. Cependant, on observe globalement une corrélation positive entre progression clinique de la maladie et excrétion fécale. D'autre part, pour un même individu, l'excrétion fécale peut varier au sein d'une même phase, pouvant passer d'aisément détectable à indétectable en l'espace de quelques semaines, et inversement. Plus l'expression clinique progresse, plus la variation porte sur le niveau d'excrétion et non sa détectabilité. Par ailleurs, il a été observé que Map avait une tendance à ne pas rester libre dans les fèces, mais au contraire à s'agglutiner, formant des amas de Map, et conduisant ainsi à une grande disparité de concentration locale dans un échantillon.

La principale hypothèse avancée concernant la variabilité de l'excrétion fécale entre individus et au cours du temps est celle d'un impact de la réponse immunitaire. En effet il est supposé que, selon la modalité de la réponse mise en place, la lutte immunitaire est plus ou moins efficace dans le contrôle de Map, et donc sur son excrétion. Cette hypothèse a été explorée de façon expérimentale (Ganusov et al. 2015) et par modélisation (Magombedze et al. 2017). Leurs observations pointent vers la tendance suivante : une réponse humorale à l'infection est systématiquement positivement corrélée à l'excrétion fécale ; une réponse cellulaire est, le plus souvent mais pas exclusivement, négativement corrélée à l'excrétion fécale, ce qui concorde avec les résultats présentés paragraphe III.2.3. Cependant, l'existence d'une causalité et, le cas échéant, le sens de celle-ci, restent à établir.

La tendance de Map à former des amas bactériens se traduit par des résultats similaires à ceux observés par Crossley et al. (2005) : dans près de 25% des analyses effectuées par coproculture, seul un réplica parmi 4 d'un même échantillon de fèces positives était positif (Crossley et al. 2005). Cela explique en partie la faible sensibilité observée des tests diagnostiques utilisés sur le terrain, et complique l'interprétation de résultats négatifs. Un autre facteur explicatif réside dans les variabilités d'excrétion, qui rendent les tests diagnostiques complexes à mettre en place et à interpréter avec certitude. Cela est particulièrement vrai pour les animaux asymptomatiques ou subcliniques, qui sont les formes les plus fréquentes et les principaux agents de la dissémination de Map inter-élevages (Magombedze et al. 2017). La problématique principale concernant la paratuberculose de nos jours est le développement de méthodes diagnostiques

précoces et fiables, permettant un dépistage et un contrôle efficaces, et à moindre coût, de la propagation de la maladie sur le territoire.

III.3. Expressions cliniques

La paratuberculose peut s'exprimer de façons très diverses. Il faut dans un premier temps bien distinguer les notions de lésion et de symptôme. La lésion est une entité physique STRUCTURELLE pouvant, ou non, être à l'origine de signes cliniques ; en revanche, le symptôme est une manifestation FONCTIONNELLE de la maladie.

III.3.1. Formes lésionnelles

La lésion élémentaire de paratuberculose est un granulome se formant dans la paroi intestinale, principalement iléale, suite à la réaction cellulaire locale. Toutefois, l'infection par Map ne s'exprime pas exactement de la même façon en fonction de l'espèce touchée. Chez les bovins et les ovins, deux formes lésionnelles ont été décrites, distinguant la forme paucibacillaire et la forme multibacillaire à l'échelle microscopique, chacune évoluant à partir d'un granulome initial. Chez les ovins, s'ajoute une forme alésionnelle. En effet, même si un bovin infecté ne présente pas de signes cliniques évoquant la paratuberculose, des lésions histologiques seront observées, alors qu'un ovin infecté pourrait ne pas avoir de lésions visibles (Gillan et al. 2010).

La forme paucibacillaire prédomine dans les premiers stades de développement de l'infection et chez les animaux faiblement contaminés. Elle est caractérisée par une infiltration de la muqueuse et sous-muqueuse intestinale. L'infiltrat est essentiellement lymphocytaire, avec présence de quelques macrophages et cellules de Langhans. Peu de bacilles sont dénombrés dans ce type de lésion.

Les formes multibacillaires s'établissent dans les stades plus avancés. Elles sont caractérisées par un infiltrat généralisé de macrophages épithélioïdes dans la muqueuse, la sous-muqueuse et la lamina propria. On dénombre de très nombreux bacilles au sein de ces macrophages.

La première lésion formée après contamination de l'intestin grêle par Map est un granulome, comme nous l'avons évoqué précédemment, localisé dans la paroi intestinale au niveau des plaques de Peyer. Cependant, avec l'évolution de l'infection, les lésions observées évoluent

aussi. Les lésions digestives de paratuberculose ont été décrites à de nombreuses reprises et notamment par Chiodini et al. (1984), puis ont été formellement classifiées par Perez et al. (1996) sous différents types lésionnels retrouvés Tableau 2.

Tableau 2: Classification des lésions digestives de paratuberculose (Pérez, García Marín, et Badiola 1996)

Type	Localisation	Apparence	Population immunitaire	Population BAAR	Lésions associées
1	Plaques de Peyer NL mésentériques +	Granulomes	Macrophages ++ Lymphocytes +	Non	Pas de lésion
2	Plaques de Peyer, passage de la lamina propria, et muqueuse proche.	Granulomes ronds, bien délimités	Macrophages ++ Lymphocytes +	Rares BAAR	Pas de lésion
3a	Plaque de Peyer, lamina propria, muqueuse proche ou non des plaques	Granulomes plus grands, multifocaux	Macrophages, lymphocytes dans les granulomes, et rarement autour des vaisseaux sanguins /lymphatiques	BAAR souvent visibles	Elargissement occasionnel de vaisseaux lymphatiques iléaux, épaissement des villosités
3b	Plaques de Peyer, muqueuse proche ou non des plaques	Entérite granulomateuse diffuse par convergence de nombreux granulomes	Infiltration macrophagique sévère, infiltration lymphocytaire légère dans la muqueuse. Quelques cellules géantes et cellules de Langhans	Nombreux BAAR dans la muqueuse	Erosion épaissement voire fusion des villosités, comblement des cryptes ; Lymphangite et lymphangiectasie. Œdème de la sous-muqueuse
3c			Infiltration lymphocytaire sévère de la lamina propria et de la muqueuse. Cellules géantes et cellules de Langhans		

NL : Nœud lymphatique

Lors des observations ayant mené à cette classification, il a été noté que les différentes formes lésionnelles pouvaient coexister. Ainsi, les lésions de type 2 sont accompagnées de lésions de type 1 dans les nœuds lymphatiques mésentériques et les plaques de Peyer. De même, celles de type 3 sont accompagnées de type 1 et 2 dans les nœuds lymphatiques mésentériques et iléo-caecaux. Les lésions observées semblent évolutives et conduire à l'établissement d'une entérite granulomateuse diffuse hypertrophiante. La particularité que l'on peut noter ici est l'existence de deux formes lésionnelles avancées, l'une caractérisée par une population immunitaire macrophagique dominante et de nombreuses Map, l'autre par une population majoritairement lymphocytaire, avec un faible nombre de Map. Ces deux formes sont alors nommées

respectivement multibacillaire et paucibacillaire, et semblent associées à des réponses immunitaires différentes.

A l'échelle macroscopique, l'infiltration de la muqueuse donne lieu à l'érosion des villosités intestinales. Ceci se traduit par un épaissement macroscopique de la paroi. On observe donc une entérite chronique hypertrophiante, avec syndrome de malabsorption et hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques.

Chez de nombreux animaux atteints de paratuberculose, il a été observé des granulomes à Map dans des localisations extra-digestives, suite à la dissémination lymphatique et sanguine des bacilles et des macrophages contaminés. Les organes touchés comptent essentiellement le foie, les reins et la rate, ainsi que les nœuds lymphatiques, du fait de leur irrigation sanguine importante. Les lésions associées sont de type granulomateux, avec parfois formation de foyers caséux. L'existence de foyers extra-digestifs a été préférentiellement reliée à l'existence de formes étendues (3b et 3c) : des biopsies hépatiques ont été jugées pertinentes dans le diagnostic de maladie de Johne ayant atteint ces stades microscopiques, avec une sensibilité de 96% (95% IC : 0.87-0.99) et une spécificité de 100% (95% IC : 0.95-1) (Smith et al. 2014).

III.3.2. Formes cliniques

La durée d'incubation de la paratuberculose est longue et la phase clinique est d'évolution chronique. L'excrétion bactérienne varie au cours du temps, et n'est pas systématiquement associée aux signes cliniques, qui eux-mêmes ne sont pas caractéristiques de la maladie. Cela fait de la maladie de Johne une pathologie pour laquelle les informations cliniques ne permettent pas d'établir plus qu'une suspicion. L'évolution de la maladie peut être découpée en plusieurs étapes, selon le niveau d'expression clinique et d'excrétion bactérienne.

– Phase prodromique :

Pendant une période allant de deux mois (Stewart et al. 2004) à deux ans, selon l'âge à la contamination et la sensibilité de l'individu, Map ne cause pas de modifications suffisantes du tractus digestif pour impacter son hôte, et n'est pas excrétée dans le milieu extérieur, ou bien à des niveaux difficilement détectables. L'animal est donc dans ce cas asymptomatique non excréteur.

– Phase asymptomatique

Lorsque la colonisation de la muqueuse intestinale par Map atteint un niveau suffisant, la proportion de bacilles étant excrétés dans la lumière intestinale deviendra suffisante pour être détectable et éventuellement contaminante. Comme nous l'avons vu, l'excrétion fécale se révèle fortement inconstante au cours du temps. Pendant cette période, qui peut durer plusieurs mois à deux ans, l'animal est excréteur de manière inconstante mais à des niveaux généralement bas, en étant toujours asymptomatique. Ces individus sont les plus susceptibles de maintenir la présence de la maladie dans un élevage ou de la transmettre dans d'autres élevages lors de mouvements.

– Phase d'expression

Lorsque les lésions prennent suffisamment d'ampleur pour entraîner un syndrome de mal-assimilation (perte des villosités), les animaux infectés vont développer des symptômes, deux à dix ans après infection. De manière subclinique d'abord, avec une baisse de production (production laitière, GMQ) et une plus grande susceptibilité à d'autres affections. Puis seront observés de véritables signes cliniques, parallèlement à la progression des lésions, de manière d'abord fruste puis de plus en plus nettement. La maladie se manifeste alors par un amaigrissement chronique, caractérisé par une perte de masse graisseuse et musculaire, avec conservation de l'appétit, présence de diarrhée (systématique chez les bovins, plus rare chez les ovins), sans hyperthermie. Les individus en phase clinique sont le plus souvent fortement excréteurs, même si cette excrétion peut encore être intermittente. Pendant cette phase est aussi observée une anémie, souvent accompagnée d'hypoprotéinémie.

– Phase terminale

La progression de la maladie conduit l'animal à la cachexie et la léthargie, malgré la conservation de l'appétit. L'évolution est mortelle par dénutrition, déshydratation et susceptibilité à d'autres affections. La mort survient plusieurs années après infection, et la vitesse d'évolution dépend de facteurs individuels, ce qui rend très complexe l'identification précise de la source de contamination d'un élevage.

– Rémission ou guérison

Il a déjà été observé que des animaux ayant été contaminés par Map, et ayant excrété la bactérie dans leurs fèces pendant la première année après infection, ont cessé d'excréter quelques mois

plus tard (Stewart et al. 2004). Cela laisse supposer la possibilité d'une guérison de la paratuberculose, ou a minima un contrôle de l'infection suffisant pour empêcher une excrétion fécale détectable.

La chronologie présentée ci-dessus permet de comprendre que le diagnostic de la paratuberculose ne peut être fait uniquement sur la base de signes cliniques. Or, de par son caractère contagieux, et prenant en compte les différents impacts, tant économiques que sanitaires, il est important de déterminer le statut d'un élevage pour pouvoir mettre en place des mesures adaptées.

IV. Les méthodes de diagnostic, de contrôle et de lutte

IV.1. Dépistage de la paratuberculose

Différents tests de laboratoire existent dans le but de dépister la paratuberculose. Ceux-ci comprennent d'une part les méthodes directes et d'autres part les méthodes dites indirectes. Pour évaluer leur pertinence, la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) des tests doivent être évaluées. La sensibilité est la capacité d'un test à obtenir un résultat positif lorsque l'individu est effectivement infecté, et la spécificité la capacité d'un test à obtenir un résultat négatif lorsqu'un individu est indemne.

IV.1.1. Les méthodes directes

Les méthodes dites directes ont pour objectif de rechercher l'agent en cause de la maladie : *Mycobacterium avium spp. paratuberculosis*. De nombreuses méthodes existent pour permettre la recherche de tout ou partie de Map dans des échantillons issus d'animaux de statut inconnu. Qu'elles interviennent avant ou après la mort de l'animal, leur spécificité vis à vis de la paratuberculose est bonne, mais leur sensibilité est très variable d'un test à l'autre. Seules les principales techniques utilisées dans la pratique expérimentale et clinique seront ici développées.

– Bactérioscopie et histopathologie

La bactérioscopie et l'histopathologie consistent en la mise en évidence de Map, ou a minima de BAAR (Bacilles acido-alcoolol résistants) par microscopie photonique, sur des lames de

matières fécales ou de tissus. Dans le cas de tissus, ceux-ci peuvent être prélevés ante-mortem par biopsie ou post-mortem par prélèvement nécropsique, en prenant soin de choisir des tissus parmi les plus susceptibles d'être infectés par Map : paroi intestinale iléale et nœuds lymphatiques mésentériques principalement. Comme exposé précédemment, une recherche histologique sur foie est possible mais n'est sensible que pour les stades avancés. Une fois l'échantillon monté sur lame, une coloration à l'émalun-éosine permet l'identification de lésions granulomateuses, et la coloration de Ziehl-Neelsen permet la mise en évidence de BAAR. La spécificité est donc médiocre puisque les germes observés peuvent être différents de Map.

– Culture

La mise en évidence par culture consiste à l'ensemencement d'un milieu, le plus utilisé étant le milieu liquide Herrold avec mycobactine, à partir d'un échantillon de fèces, de lait ou de tissu. Cependant, Map présente une culture complexe en laboratoire, car la croissance des colonies est très lente, avec un temps de génération d'environ 20 heures. De ce fait une culture peut conduire à un résultat positif après environ 3 semaines suivant l'ensemencement, et aucun résultat ne peut être considéré comme négatif avant environ 20 semaines.

– PCR (Polymerase Chain Reaction)

La réaction en chaîne par polymérase vise à l'amplification d'un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans un échantillon. Sont ajoutés à l'échantillon des amorces d'ADN complémentaires et spécifiques du fragment recherché, des nucléotides et une enzyme de polymérisation de l'ADN, ainsi que des marqueurs spécifiques du segment amplifié, de sorte que seul l'échantillon initial soit limitant dans la réalisation des polymérisations. Le mélange est ensuite soumis à une série de cycles (entre 45 et 50), chacun permettant l'ouverture des doubles hélices d'ADN, l'hybridation d'une amorce avec le fragment d'ADN recherché, puis la polymérisation de son complément. Ainsi, à chaque cycle, la quantité d'ADN est théoriquement doublée.

Plusieurs segments spécifiques de Map sont connus et peuvent être utilisés pour la PCR. Le plus couramment employé est le segment IS 900, correspondant à 1450 paires de bases (Cousins et al. 1999), répétées entre 14 et 18 fois dans le génome de la mycobactérie.

La PCR peut être réalisée selon une variante utilisant un fluorophore qui est révélé lorsque l'ADN polymérase est active. On la nomme PCR quantitative ou qPCR, ou encore PCR en temps réel, car elle permet un suivi en temps réel de l'activité de polymérisation, et la réalisation de courbes de fluorescence grâce aux informations obtenues cycle par cycle. Ces courbes de fluorescence sont classiquement des sigmoïdes qui donnent des renseignements supplémentaires par rapport à la PCR classique. Elles permettent notamment une lecture graphique des amplifications, facilitant la mise en évidence de courbes aberrantes, et permettent d'estimer la quantité d'ADN initialement présente dans un échantillon.

Les échantillons utilisés pour cette méthode sont usuellement des fèces en prélèvements individuels, mais il est possible d'utiliser du lait ou des prélèvements tissulaires. Quel que soit le choix, il est nécessaire de passer par une étape d'extraction de l'ADN de la mycobactérie, et le cas échéant par une étape préalable de broyage cellulaire afin de récupérer les mycobactéries intracellulaires.

IV.1.2. Les méthodes indirectes

L'infection par Map est à l'origine d'une réaction immunitaire spécifique. Le but des méthodes de dépistage indirectes est de mettre en évidence cette réaction immunitaire, qu'elle soit cellulaire ou humorale.

– Intradermoréaction

Cette méthode consiste en l'injection sous-cutanée d'un extrait protéique purifié de Map, suivi d'une mesure au cutimètre du pli de peau à l'emplacement de l'injection à H0 et H72. Un épaississement de la peau de 3mm ou plus est observé en cas de réaction inflammatoire, caractérisée par un afflux de lymphocytes T auxiliaires et de macrophages principalement.

– Test à l'interféron gamma

Ce test est réalisé en mettant en contact un extrait protéique purifié de Map et des lymphocytes T circulants de l'animal testé. Si l'animal exprime une réponse immunitaire à médiation cellulaire vis à vis de Map, autrement dit qu'il a déjà été en contact avec Map, ses lymphocytes réagiront en produisant de l'interféron gamma, dont la quantité dans le mélange est mesurée après incubation pendant 24h.

Ces deux méthodes de dépistages nécessitent l'existence d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire active vis-à-vis de Map chez l'animal testé ce qui, comme nous l'avons vu, les rend très peu sensibles quelques mois après infection lorsque la réponse est à dominante humorale.

– ELISA

La sérologie ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) permet la mise en évidence d'anticorps spécifiques du pathogène recherché dans un échantillon de sérum. Elle ne peut cependant être réalisée qu'après séroconversion ce qui, n'arrive que tardivement après l'infection. Cette technique nécessite la mise en contact du sérum concerné avec des antigènes spécifiques de MAP, eux-mêmes fixés à la plaque, qui provoqueront la formation de complexes immuns avec les anticorps anti-Map du sérum, s'ils existent. La plaque est lavée afin d'éliminer les anticorps non-spécifiques, et y sont ajoutés des anticorps anti-anticorps couplés à une enzyme. Ces couples se fixent aux anticorps précédemment fixés sur les antigènes de Map, et sont révélés par ajout du substrat enzymatique, provoquant une coloration, et donc une modification de la densité optique. Cette différence de densité optique est ensuite interprétée selon un seuil de positivité pour en retirer un résultat positif ou négatif. Une étape de pré-adsorption par contact avec *Mycobacterium phlei* permet d'améliorer la spécificité de la sérologie ELISA vis-à-vis de Map, sans toutefois la rendre parfaite (McKenna et al. 2005; Collins et al. 2005; Scott J. Wells et al. 2006).

– Autres méthodes

D'autres techniques de mise en évidence d'une réponse à médiation humorale existent, notamment le test de fixation du complément et l'immunodiffusion en gélose (AGID).

Le principe du test de fixation du complément est proche de l'ELISA : la différence principale tient dans le fait que les complexes immuns antigènes de Map / anticorps anti-Map provoquent la fixation de protéines du complément. Dans le cas où le sérum testé contient des anticorps anti-Map, les protéines du complément ainsi mobilisées ne pourront pas provoquer la lyse de globules rouges introduits au préalable sous la forme de complexe globule rouge-anticorps anti-globule rouge.

L'immunodiffusion en gélose tire parti du fait que les protéines, immunoglobulines comprises, puissent diffuser dans la gélose. Ainsi, dans une boîte de pétri contenant de la gélose, le sérum

à tester est disposé dans le puit central, tandis que les antigènes des pathogènes recherchés sont disposés dans des puits en périphérie. Après quelques jours, les protéines ont diffusé, et d'éventuels complexes immuns seront visibles sous forme de précipités entre le sérum et le puit contenant l'antigène ayant provoqué la réaction.

Cependant, ces méthodes sont moins sensibles que l'ELISA dans la recherche d'une infection subclinique par Map, et ne sont pas utilisées en routine.

Parmi les différents tests que nous avons pu voir, les plus utilisés restent la coproculture et la (q)PCR, qui ont l'avantage d'avoir une sensibilité supérieure aux autres tests disponibles. Cependant, le coût élevé de la PCR et le délai d'exécution de la coproculture, laissent chacun de ces tests avec un inconvénient majeur, limitant leur utilisation dans des mesures sanitaires à grande échelle, et dans les procédures d'assainissement. En effet, éleveurs, groupements et politiques reculent devant le coût élevé de la PCR sur un grand nombre d'animaux, et la coproculture est trop lente pour une utilisation optimale dans des situations d'assainissement et de quarantaine. La coproculture reste cependant le gold standard, mais pourrait être supplantée par la (q)PCR si le coût de cette dernière devait baisser.

IV.1.3. Analyse de mélanges d'échantillons

Depuis une dizaine d'années, le développement d'approches diagnostiques permettant de réduire les coûts d'investigation à l'échelle collective (lots d'animaux, élevages) fait l'objet d'un nombre croissant de publications scientifiques. L'une des possibilités consiste à réaliser des analyses sur mélanges d'échantillons plutôt que sur chaque individu d'un troupeau, rendant moins coûteux le volet analytique, de loin le plus important.

En 2007, une étude a été conduite sur des élevages bovins au Chili (van Schaik et al. 2007). L'objectif était alors de déterminer si la culture sur mélanges de fèces était une solution non seulement économique mais avec une sensibilité satisfaisante pour définir le statut d'un troupeau et des vaches le composant. Pour cela, 12 élevages ont été sélectionnés, pour un total de 598 vaches. Pour chaque individu ayant eu plus de 2 lactations (sélection permettant d'obtenir les individus les plus susceptibles d'excréter des Map), un prélèvement de sang a été réalisé en vue d'une sérologie ELISA individuelle, ainsi qu'un prélèvement de fèces. Chaque échantillon de fèces a été analysé par culture individuelle sur milieu liquide Herrold contenant

de la mycobactine (2g de fèces par culture). Parallèlement, des mélanges de 5 à 10 échantillons ont été réalisés (mélanges de 2g par échantillon) en respectant les classes d'âge des animaux puis mis en culture selon le même protocole. Les résultats ont alors montré que 54,3% (IC 95%, 36,3-72,2%) et 46,4% (IC 95%, 26,2-66,7%) des résultats de culture des mélanges de 5 et 10 échantillons comportant au moins un échantillon positif en culture individuelle, étaient positifs. Cependant aucune différence significative de sensibilité n'était mise en évidence pour les mélanges de 5 et 10 échantillons. A noter toutefois, 3 mélanges de 5 échantillons étaient positifs alors qu'aucun des échantillons les constituant n'étaient positifs individuellement. Les auteurs soulèvent ainsi une possible implication de l'hétérogénéité des mélanges vis-à-vis de Map (Map présents en agrégats). De plus, la prévalence semblait être un facteur influençant la sensibilité des cultures de mélanges avec une corrélation positive. *A contrario* dans cette étude, 5 élevages à faible prévalence vis-à-vis de Map (< 4 %) n'avaient pas été détectés positifs lors de la réalisation des mélanges (indépendamment de la taille du mélange).

Plusieurs autres études donnent des résultats concordants que ce soit chez les bovins ou les ovins (Dhand et al. 2010; Tavornpanich et al. 2004; Scott J. Wells et al. 2002; Sergeant et al. 2002). Enfin, dans l'étude de van Schaik et al. (2007), la solution la plus économique pour déterminer le statut d'un troupeau était de réaliser des mélanges de 10 échantillons. En revanche, l'analyse de mélanges d'échantillons de fèces n'apparaissait pas pertinente pour déterminer le statut individuel des animaux du troupeau en vue de mettre en application des mesures de lutte (en particulier réforme ciblée précoce). En effet, la durée de réalisation de la culture reste un véritable frein à son utilisation en pratique, car elle ne permet pas une gestion rapide de la maladie.

En 2010, une étude s'est cette fois intéressée aux cultures de mélanges de fèces chez les ovins (Dhand et al. 2010). 23 moutons excréteurs de Map ont été prélevés, dont 10 présentant une forme multibacillaire et 13 une forme paucibacillaire. Chaque échantillon a alors été dilué dans un échantillon négatif au 5^{ème}, 10^{ème}, 20^{ème}, 30^{ème}, 40^{ème} et 50^{ème} avant d'être mis en culture. Les résultats, exprimés en termes de sensibilité analytique, c'est-à-dire de proportion de mélanges ayant conduit à un résultat positif en culture, en fonction de la dilution et de la nature lésionnelle de l'ovin source de fèces, sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Sensibilité analytique de la culture sur mélange de fèces en fonction de la taille des mélanges et de la forme lésionnelle observée (d'après Dhand et al. 2010)

Taille de mélange	Paucibacillaires			Multibacillaires		
	Nbr +/- testés	Se	IC 95%	Nbr +/- testés	Se	IC 95%
5	5/13	38%	[14-68]	9/10	90%	[56-100]
10	4/13	31%	[9-61]	10/10	100%	[69-100]
20	3/13	23%	[5-54]	9/10	90%	[56-100]
30	1/13	8%	[0-36]	8/10	80%	[44-97]
40	1/13	8%	[0-36]	10/10	100%	[69-100]
50	0/13	0%	-	8/10	80%	[44-97]

Les résultats de cette étude indiquent que les individus ayant une forme plus avancée de la maladie (atteintes multibacillaires) étaient retrouvés très facilement par culture, même dans un mélange de 50 échantillons. A l'inverse, la sensibilité était faible à très faible, y compris pour des faibles dilutions (Se = 38% pour les dilutions 5) pour les ovins atteints de formes paucibacillaires. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Whittington et al. (2000) bien qu'ils obtenaient de meilleures sensibilités en diluant au 50^{ème} des fèces de 20 ovins atteint de formes paucibacillaires : (50%, IC95% [27-73])

Récemment, une étude Canadienne a eu pour but d'évaluer l'utilisation de PCR et de sérologies ELISA modifiées (notée mELISA) sur le lait de tank de troupeaux ovins et caprins, par rapport aux méthodes standards sur échantillon individuel (Bauman et al. 2018). Pour cela, 29 élevages caprins et 21 élevages ovins laitiers ont été sélectionnés. Pour chacun d'entre eux, un échantillon issu du tank à lait a été prélevé (correspondant à 7 traites ou 3,5 jours), ainsi que des prélèvements individuels de fèces, sang, et lait sur 20 individus (animaux en lactation de plus de 2 ans)¹. L'étude a alors consisté en la réalisation, sur les laits de tank (ou de mélange), d'une PCR ainsi qu'une sérologie ELISA modifiée correspondant au protocole élaboré par Wilson et al. (2010), d'une PCR sur fèces individuelles et de sérologies ELISA sur les échantillons individuels de sérum et de lait. La PCR sur lait de tank présentait alors une sensibilité de 0% et 25% respectivement en élevages caprins et ovins (sensibilité basée sur les échantillons positifs en cultures sur fèces individuelles). En ce qui concerne les sérologies

¹ Pour 7 élevages ovins, le lait n'était pas conservé en tank mais de façon individuelle. Un mélange a donc été réalisé avec le lait des différentes brebis dans des proportions égales.

mELISA, une sensibilité de 33,3% à 34,8% a été mise en évidence chez les caprins et de 46,7% à 50,7% chez les ovins (basée sur la culture fécale et la PCR).

Notons qu'à l'heure actuelle, aucune donnée publiée n'est disponible sur les performances de la qPCR appliquée à des mélanges de fèces, que ce soit chez les bovins ou les ovins.

Un tableau récapitulatif des caractéristiques des tests est présenté Tableau 4.

Tableau 4: Récapitulatif des caractéristiques des tests de dépistage de la paratuberculose

	Culture	PCR	IFN-gamma	IDC	ELISA
Dépistage des non excréteurs	Non	Non	Possible	Possible	Possible
Dépistage des excréteurs asymptomatiques	Oui (seuil de 10 ² bactéries/g)	Oui (seuil de 10 ² bactéries/g)	Oui	Oui	Oui
Sensibilité	16% [2 ;48] (2)	47,5% [29,3-69,9] (1)			17,5% [11-25,8] (1)
Spécificité	97 % [95 – 99] (2)	99% [97,9 – 99,9] (1)	93,6% [92-95] (3)	93,5 % (3)	94,5% [93-96] (1)
Influence de la vaccination	Oui par possible réduction de l'excrétion		Oui (réaction croisée)		
Coût moyen en France	≈ 15€ / analyse	≈ 30€ / animal		< 1€ l'unité mais difficile de se procurer les tuberculines	≈ 6€ / animal
Temps de réalisation	8 – 12 semaines	72h	48h	72h	48h
Possibilité d'analyse sur mélange	Oui	Pas de donnée	Pas de donnée	Sans objet	Pas de donnée

(d'après Agence française de sécurité sanitaire des aliments 2009 modifiée)

(1) Mathevon et al. 2017

(2) Nielsen et Toft 2008

(3) Kalis et al. 2003

Les sensibilités et spécificités indiquées dans les tableaux sont les plus grandes établies dans les études considérées, mais il est à noter que chaque méthode d'analyse a vu apparaître des variations des paramètres des

tests en fonction du kit et de l'appareil (Yoann Mathevon et al. 2017) (Fock-Chow-Tho et al. 2017) , ou de l'algorithme d'analyse (3) choisi.

IV.2. Mesures de maîtrise et de prévention

Dans le cadre d'un élevage indemne, la priorité est de ne pas introduire d'individus atteints dans le troupeau. Les mesures de lutte contre la paratuberculose vont donc se résumer au contrôle des achats et des mouvements (pâtures). A l'inverse, pour un élevage atteint par la paratuberculose, des mesures doivent être prises pour limiter la circulation et l'impact sanitaire et zootechnique de la maladie.

IV.2.1. Prévention de l'introduction dans les élevages sains

Empêcher la contamination d'un élevage indemne, ou considéré comme tel, par la paratuberculose, conduit à contrôler les achats afin de limiter le risque d'introduction d'un animal infecté et susceptible de contaminer le reste du cheptel et les contacts avec des animaux d'autres élevages infectés. Cela est fortement compliqué par le nombre important d'excréteurs asymptomatiques parmi les individus contaminés par Map, et par l'excrétion fécale intermittente qui limite les performances de certains tests diagnostiques à l'introduction. Il est conseillé de ne procéder qu'à des introductions en provenance d'élevages indemnes, ou de procéder à un dépistage systématique des individus introduits. La première méthode repose sur l'existence d'un dispositif de certification des élevages concernés, et la seconde implique des contraintes zootechniques non négligeables, ce qui les rend toutes deux délicates à mettre en place de manière individuelle. Un autre problème à considérer est celui des pâtures, lors desquelles des mélanges de troupeaux sont possibles lors d'estive notamment. Une contamination peut se produire lors du mélange d'un troupeau indemne et d'un troupeau non indemne, et cette éventualité doit être considérée.

De par le monde, de nombreux plans de lutte ont été édifiés et sont constitués, au moins en partie, de programmes de prévention, comme nous l'évoquerons plus tard. En France, le plan de prévention de référence est celui défini par l'Association pour la certification en santé animale (ACERSA) à partir de 2004. Cette organisation à but non lucratif, reconnue par le Ministère de l'Agriculture, rassemble des représentants des éleveurs et des vétérinaires, et travaille à l'établissement de plans de contrôle de maladies non-réglementées. L'objectif du plan

pour la paratuberculose est de permettre la certification des individus adultes des élevages bovins vis-à-vis de l'infection par Map, et ce malgré l'absence de garantie absolue due au manque de sensibilité des tests. Le résultat final n'est donc pas une véritable "certification indemne" de paratuberculose, mais bien une limitation du risque de transmission inter-élevages. Ce plan établi des recommandations, et leur application précise repose entre les mains des Groupements de Défense Sanitaire (GDS) départementaux. De fait, toute participation à ce plan repose sur le volontariat. Les recommandations de l'ACERSA sont présentées ci-après (ACERSA 2005).

– Acquisition de la garantie :

La garantie est délivrée à l'élevage après analyses individuelles de tous les bovins de plus de deux ans, à deux reprises avec un intervalle de 9 à 30 mois entre les deux analyses. Les méthodes recommandées, sont la PCR sur fèces, la coproculture et la sérologie ELISA individuelle. Si à l'issue de la première vague d'analyses, des individus sont confirmés positifs, ils doivent être abattus au moins 24 mois avant la seconde vague d'analyses. Les analyses d'obtention de la garantie ne peuvent commencer que 36 mois après la dernière vaccination dans l'élevage, et les animaux vaccinés ne seront pas testés ce qui les exclut de la garantie.

– Maintien de la garantie :

Un premier contrôle d'entretien est à réaliser 9 à 15 mois après le second contrôle d'obtention de la garantie sur tous les animaux de plus de deux ans, puis des contrôles seront répétés tous les 21 à 27 mois sur les animaux âgés de 2 à 6 ans.

– Contrôles à l'introduction :

Une fois un élevage sous garantie, tout bovin introduit sera testé à deux reprises, avec un intervalle de 9 à 15 mois, à partir de ses 18 mois, et ne sera sous garantie qu'après un résultat négatif aux deux tests.

– Confirmation des positifs :

Les individus pouvant faire l'objet d'une confirmation sont ceux ayant un résultat positif à leur second test d'introduction ; peuvent aussi être confirmés les résultats positifs d'un test d'obtention de la garantie, si moins de 2% de l'élevage est positif, afin de limiter les doutes liés à la spécificité des tests. Les méthodes d'analyses utilisées pour confirmation sont : la PCR sur

le germe cultivé pour confirmer une culture fécale, et la PCR ou la culture fécale pour confirmer un résultat de sérologie ELISA. Cependant, dans le cas d'une sérologie ELISA positive et d'une confirmation négative, on pourra soit éliminer le bovin concerné, soit le conserver. Dans les deux cas, cet individu et ses derniers descendants sont exclus de la garantie, mais dans le second cas un double contrôle par PCR ou culture et sérologie ELISA est réalisé. Une PCR ou culture positive signe le retrait de la garantie pour tout le cheptel, tandis qu'un résultat négatif conduit à une nouvelle dichotomie : Si la sérologie ELISA est négative, le bovin et le cheptel conservent leur garantie, si elle est positive le bovin doit être éliminé sous peine de retrait de la garantie pour tout le cheptel.

Les choix des fréquences et méthodes d'analyse pour les élevages enrôlés sont fait au niveau départemental par les GDS, qui subventionnent parfois (5 des 11 départements du grand ouest) tout ou partie des coûts d'analyse. Dans l'ensemble, les programmes de certification restent peu attractifs à l'heure actuelle.

IV.2.2. Maîtrise sanitaire au sein des élevages infectés

Les objectifs des mesures de lutte en élevage infecté vont s'orienter selon deux axes : d'une part, il s'agit de limiter la propagation de la maladie dans le cheptel, et donc de protéger de l'infection les individus encore indemnes ; d'autre part, pour avoir une efficacité des mesures précédentes, il est aussi indispensable d'éliminer les sources de pathogènes, à savoir les individus infectés.

L'essentiel de la maîtrise de la paratuberculose en élevage infecté repose sur une réduction de l'exposition des animaux sains et sensibles par une bonne gestion des concentrations et des mouvements d'individus, ainsi que sur la désinfection des locaux. Les individus les plus sensibles étant les plus jeunes, limiter leur exposition à des fèces et à du lait contaminés est une des mesures les plus efficaces. Cela implique une séparation stricte des jeunes et des adultes, et si possible, des animaux sains et contaminés (Mitchell et al. 2012). Ainsi, il existe une corrélation positive entre la précocité de contact jeune-adulte et la prévalence de la paratuberculose dans l'élevage (Norton, Heuer, et Jackson 2009). La séparation précoce des veaux de leur mère influence aussi les risques de contamination pseudo-verticale. Enfin, il est idéal de distribuer du lait ou du colostrum issu de vaches certifiées indemnes de paratuberculose, ou des aliments du commerce. Cependant, la survenue de l'excrétion fécale de

Map étant tardive, la séparation des classes d'âges au sein d'un groupe de jeunes est moins importante pour cette maladie qu'elle ne l'est pour de nombreuses autres affections, notamment pulmonaires et digestives. Le nettoyage et la désinfection régulière des locaux sont à réaliser aussi souvent que possible, et de préférence en utilisant des peroxydes puisque ce produit présente une très bonne efficacité vis-à-vis de Map. Les espaces de mise-bas et les logements des jeunes doivent être particulièrement surveillés pour limiter les risques de contamination des individus les plus sensibles.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, l'environnement peut aussi être source de contamination (abreuvoirs, sols, ...) et doit être pris en compte en terme de nettoyage, désinfection, ou de pratiques d'élevage. Ainsi, l'épandage de fumier sur des parcelles destinées au pâturage est une pratique à risque. Enfin, comme pour tout agent pathogène, une résistance optimale est attendue pour les individus en bon état général et non carencés. Une attention particulière est donc à porter à la gestion du parasitisme et à qualité de les couverture des besoins alimentaires.

Toutes les mesures précédemment évoquées reposent sur le caractère insidieux et intermittent de l'excrétion de Map par les individus infectés, et participent de manière générale à une meilleure protection vis-à-vis de nombreuses pathologies. Cependant, afin d'obtenir un assainissement aussi définitif que possible vis-à-vis de la paratuberculose, l'élimination des individus responsables de la pression d'infection apparait essentielle.

Ainsi, le dépistage systématique que nous avons évoqué en tant que mesure préventive, par le biais des qualifications, peut aussi servir en tant que mesure de maîtrise : un tel dépistage permet d'identifier les individus potentiellement excréteurs et de les écarter du cheptel. Pour ces individus infectés sont notamment envisageables une réforme anticipée ou un abattage, à moduler selon la gravité de l'atteinte (subclinique, clinique). Cependant, la faible sensibilité des tests disponibles fait que ces mesures sont souvent d'une efficacité limitée, de nombreux individus infectés n'étant pas détectés (présence de faux négatifs). L'importance des mesures de réduction des facteurs de risque au sein de l'élevage est donc capitale, afin que les animaux faux négatifs n'impactent qu'un minimum le statut du reste du cheptel.

Tout comme les mesures de prévention, ces mesures de maîtrise font partie intégrante de nombreux plans de lutte contre la paratuberculose dans le monde entier. En France, les élevages bovins peuvent bénéficier d'un plan visant à assainir le cheptel, centré sur l'élimination des individus excréteurs. Ce plan, basé sur le volontariat et des propositions, repose sur l'isolation de tout animal suspect de paratuberculose, et sur la confirmation de l'infection par qPCR sur fèces ou ELISA. En dehors des suspicions, un dépistage annuel est recommandé afin de détecter et réformer les individus excréteurs. Cette réforme peut aussi être étendue aux derniers descendants des vaches excrétrices, de la même manière que les descendants d'individus non indemnes devaient être testés dans le cadre du plan de l'ACERSA. Dans le cadre d'un cas clinique de paratuberculose, la recommandation de réforme porte même sur toute la descendance. Les propositions contiennent aussi des bonnes pratiques d'élevage à adopter afin de réduire la contamination du cheptel par les individus excréteurs, comme vu précédemment. Du fait de l'importante charge de travail supplémentaire que représente un tel plan, et d'une efficacité discutable, peu d'éleveurs font le choix de le suivre, ou de le mener à son terme une fois commencé. De telles mesures en élevage ovin ou caprin sont encore plus difficiles à envisager du fait de la taille des troupeaux, et leur efficacité ne serait pas nécessairement meilleure.

D'autres plans sont envisagés au niveau local selon les GDS, allant de la simple communication sur la paratuberculose à une surveillance programmée avec abattage des individus contaminés.

IV.2.3. Plans de lutte contre la paratuberculose

Nous l'avions précédemment évoqué, de nombreux protocoles de lutte ont été mis en place dans le monde, et il s'agit en majorité de plans de surveillance active de la paratuberculose. Certains sont répertoriés dans le Tableau 5 d'après les informations partagées lors du 4e Forum sur la Paratuberculose en 2014 à Parmes (efsa 2014). Ces quatre pays européens ne sont que des exemples, d'autres plans existant dans la majorité des pays européens, nord-américains et du Pacifique, à des échelles nationales ou régionales. Ils sont cependant représentatifs des diverses modalités de ces plans.

La grande majorité des plans nationaux et régionaux a été mise en place pendant la décennie 2000- 2010, les plus anciens remontant aux années 1990 (Norvège). La prise en compte de la

paratuberculose comme une problématique collective et non uniquement intra-élevage est donc relativement récente, et les programmes mis en place sont de fait bien souvent expérimentaux ou peu suivis. Si certains sont obligatoires et pris en charge par le gouvernement, la plus grande part repose sur le volontariat et est prise en charge, quand elle l'est, par des organismes et/ou industries régionaux, à l'image de la France. L'analyse de ces programmes révèle sans surprise que ce financement est un des déterminants essentiels de la motivation des éleveurs. Une bonne communication et la levée de la stigmatisation liée à la paratuberculose sont aussi déterminants dans le suivi des recommandations et des procédures.

Tableau 5: Principales caractéristiques de plans de lutte nationaux.

Pays	Mise en place	Obligation	Animaux concernés	Mesures clés	Compensation (source)
Autriche	2006 – 2011	Oui	Bovins Caprins Ovins Cervidés d'élevage	Suspicion : diagnostic clinique, cachexie à l'abatage Conséquences : sortie du circuit de distribution, isolement, prélèvements Confirmation : ELISA (sang), PCR (fèces, tissus) Conséquences : abattage individuel, analyse du troupeau	Oui (gouvernement)
Belgique	2006 – en activité	Non	Bovins laitiers	Analyses : Sérologie (ELISA) systématique des adultes, PCR des sérologies positives Catégorisation des élevages : Catégorie A (risque faible) ; B (risque moyen) et C (risque élevé) Conséquences : fréquence des analyses selon le statut ; animaux positifs abattus ou équarris (sauf élevages C)	Oui (chaîne de production laitière Belge) sauf élevages C
Rép. Tchèque	2008 – en activité	Non	Bovins	Suspicion : clinique Analyses : sérologie (ELISA), positifs confirmés par PCR Conséquences : restriction de la vente et des déplacements du troupeau, abattage des positifs.	Non
Danemark	2006 – en activité	non	Bovins laitiers	Analyses : tous les adultes des élevages volontaires, 4 fois par an, par ELISA (lait) Catégorisation des mères et des veaux : rouges (abattage recommandé), jaunes (mesures sanitaires à appliquer) et verts (pas de mesure)	Non

En ce qui concerne la méthodologie, le choix de la modalité de surveillance varie grandement, aucune tendance ne se dégageant clairement entre une surveillance planifiée et une surveillance

évènementielle. Etant donné le caractère discret de la pathologie, il est cependant noté que les plans reposant sur une surveillance évènementielle des cas cliniques se révèlent souvent décevants, bien que moins coûteux. Les objectifs idéaux de ces plans portent sur une réduction de la prévalence nationale (prévalence parmi les élevages et au sein des élevages), et/ou sur un contrôle des échanges inter-élevages. Si dans l'ensemble les résultats des plans se sont révélés satisfaisants en terme de prévalence, les mesures visant à limiter les réintroductions et contrôler les échanges (qualification des élevages) se sont souvent révélées décevantes. Cela semble essentiellement dû au fait que, comme en France, seule une petite partie des élevages est qualifiée, et ce nombre ne permet pas d'assurer les renouvellements via des élevages qualifiés uniquement.

IV.2.4. Vaccination

A l'heure actuelle, seuls trois vaccins contre Map sont commercialisés par deux laboratoires à travers le monde. Il s'agit du Mycopar® (Solvay Animal Health), du Guidair® et du Silurum® (CZ veterinaria SA). Seul le Silurum ® possède une AMM chez les bovins en France, le Guidair® disposant d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) pour les ovins et les caprins. Dans tous les cas, leur mise en œuvre nécessite une autorisation de la Direction Départementale pour la Protection des Populations (DDPP), et une preuve de la présence de la paratuberculose dans le troupeau.

Les trois vaccins utilisés dans le monde ne protègent que très partiellement de l'infection. Cependant, une méta-analyse par Bastida et Juste (2011) a montré un effet bénéfique notable de la vaccination, quoique très variable entre les études, sur plusieurs facteurs : réduction du nombre de cas cliniques et de la mortalité, réduction du nombre d'individus excréteurs ainsi qu'une diminution de l'extension des lésions digestives.

Dans le cadre d'une vaccination du troupeau contre la paratuberculose, la recommandation principale est la vaccination des jeunes, afin de limiter les effets néfastes sur leur production future. En revanche, la présence de granulomes au point d'injection après vaccination est un facteur dépréciatif de la carcasse, et réduit souvent l'utilisation de la vaccination aux individus reproducteurs. La vaccination des adultes est à discuter dans un élevage contaminé, puisqu'elle permet à minima de réduire la pression d'infection au sein du troupeau. Le principal problème

de l'utilisation de vaccins est qu'ils sont à l'origine de réactions croisées positives lors d'intra-dermo-tuberculinations simples dans le cadre de la surveillance de la tuberculose bovine et caprine. La mise en place d'une vaccination est alors soumise au statut indemne du troupeau vis-à-vis de la tuberculose, et à la preuve d'une présence de paratuberculose dans l'élevage. Une autre difficulté de l'utilisation de vaccins vivants atténués est qu'ils engendrent une séroconversion forte et durable, rendant impossible la différenciation par sérologie ELISA des animaux vaccinés de ceux naturellement infectés (Mathevon et al. 2015), et inopérante la sérologie dans le suivi du statut sanitaire des troupeaux vaccinés.

IV.2.5. Traitement curatif

Comme évoqué précédemment (paragraphe II.3), les mycobactéries présentent des résistances à bon nombre de désinfectants courants, et Map est résistant à certains antibiotiques anti-tuberculeux. Parmi les molécules pour lesquelles une sensibilité a été identifiée, essentiellement en médecine humaine, on retrouve notamment la rifabutine, la rifampicine ou la streptomycine, ainsi que la clarythromycine. Malgré des sensibilités reconnues, plusieurs éléments compliquent le traitement. D'une part, la guérison d'infection par des mycobactéries nécessite des traitements durant plusieurs mois. De plus, la guérison n'est pas toujours assurée, et il est alors conseillé de poursuivre un traitement à vie pour maintenir la rémission (St-Jean et Jernigan 1991). Ceci serait donc plutôt indiqué pour les individus à haute valeur génétique et les ruminants de compagnie, étant donné le coût représenté par un tel protocole. D'autre part, en dehors de la streptomycine, aucun produit n'est commercialisé en médecine vétérinaire avec ces principes actifs, et toute utilisation dans le traitement de la paratuberculose pose la question de la santé publique si le caractère zoonotique de la paratuberculose est avéré. En effet, sans guérison définitive, un traitement à vie d'un individu infecté implique une pression de sélection très importante et favorise d'autant l'émergence de résistances des bactéries (y compris autres que Map) aux antibiotiques. Ces éléments font que sur le terrain, un traitement médical n'est jamais envisagé après un diagnostic, et le recours à la vaccination associée à des mesures de maîtrise des risques sera privilégié.

IV.2.6. L'option de la sélection génétique

L'apport de la sélection génétique n'est plus contesté dans le domaine de la production animale depuis de nombreuses années. A la base focalisée sur les performances individuelles et la

conformation, la sélection génétique vis-à-vis de la résistance aux maladies connaît un essor marqué depuis plusieurs décennies (tremblante du mouton, Piétin, mammites, parasitisme gastro-intestinal...). Cette piste est aussi envisagée pour la paratuberculose.

Comme nous l'avons vu, les profils immunitaires et cliniques peuvent beaucoup varier d'un individu à l'autre mais aussi d'une race à l'autre. Ce type d'observation conduit à l'hypothèse selon laquelle, la génétique d'un individu influence sa sensibilité ou sa résilience vis-à-vis de la paratuberculose. La sélection peut alors se dérouler selon deux modalités : d'une part, une sélection phénotypique, et d'autre part une sélection génotypique, une fois des loci de caractères quantitatifs (QTL pour Quantitative Trait Loci) identifiés. Rien n'empêche cependant de mener les deux méthodes en parallèle.

Dans le cadre d'une sélection phénotypique, l'héritabilité de la sensibilité à la paratuberculose, évaluée par Gao et al. (2018) entre 0,0389 et 0,1069 (un individu sensible aura 3,89 à 10,69% de chance de transmettre ce caractère à sa descendance), est plutôt faible mais n'est pas pour autant négligeable, de même que l'héritabilité d'une résistance (0,06 à 0,27, Zare et al. 2014). Une étude a modélisé l'évolution de la prévalence de la maladie chez les bovins dans le cadre d'une sélection basée sur les seuls plans de dépistage et élimination des animaux infectés, dans le cas où ceux-ci seraient obligatoires (van Hulzen et al. 2014). Il en ressort qu'il faudrait entre 147 et 702 ans d'une telle sélection pour venir à bout de la paratuberculose, sans prendre en compte les réservoirs sauvages. Une autre étude (Ben Romdhane et al. 2017) a estimé qu'en se concentrant sur quatre traits phénotypiques clés (la baisse de sensibilité avec l'âge, l'importance de l'excrétion fécale, la période d'incubation et la dose infectieuse requise), il serait possible d'obtenir au bout de 25 ans, une incidence annuelle inférieure à un cas, pour un troupeau de 260 individus, ce qui correspondrait à un bon contrôle de la maladie.

Dans le cadre de la sélection génétique, de nombreuses études ont cherché à mettre en évidence des caractères génétiques associés à une sensibilité ou une résistance accrue à la paratuberculose. Chez les bovins, les gènes NOD2 (Ruiz-Larrañaga et al. 2010a), SLC11A1 (Ruiz-Larrañaga et al. Apr 2010b), SP110 (O. Ruiz-Larrañaga et al. Dec 2010c), TLR2 et TLR4 (Ruiz-Larrañaga et al. 2011) ainsi que CD209 (O. Ruiz-Larrañaga et al. 2012) ont, par exemple, été identifiés comme ayant un impact sur l'infection par Map, et des interactions ont été mises en évidence (Otsanda Ruiz-Larrañaga et al. 2017) ; tandis que 15 QTL potentiels ont récemment

été associés à l'infection (Mallikarjunappa et al. 2018). Chez les chèvres, le gène SLC11A a également été identifié comme corrélé à une résistance à la paratuberculose (Abraham et al. 2017), et 13 autres gènes sont suspectés d'intervenir dans la résistance à la paratuberculose dans des troupeaux italiens (Cecchi et al. 2017).

Actuellement, de nombreux facteurs génétiques potentiels de résistance sont mis à jour et explorés, mais toutes les études sont en faveur d'un déterminisme polygénétique de la résistance à la paratuberculose, avec des parts relativement faibles de chaque gène impliqué. En prenant en compte ces connaissances actuelles et les nombreuses autres approches de sélection (production, parasitisme, conformation, prolificité, etc.), il paraît pour le moment difficile de faire intervenir la génétique dans la lutte contre la paratuberculose.

Partie II : Etude expérimentale

I. Contexte et objectif de l'étude

La PCR sur fèces est une méthode couramment employée dans le dépistage de la paratuberculose chez les ruminants domestiques. Cette méthode a l'avantage de permettre une détection plus précoce qu'avec la sérologie ELISA, puisqu'elle permet de mettre en évidence le pathogène et non la réponse humorale induite. De plus, il semblerait que la PCR sur fèces soit plus sensible que la culture bactériologique (Kawaji et al. 2011). Cependant, la PCR individuelle est onéreuse et sa réalisation sur un grand nombre d'animaux n'est pas envisageable compte tenu des effectifs des troupeaux de petits ruminants. De ce fait, cette approche diagnostique n'est que très peu utilisée sur le terrain pour établir le statut de lots d'animaux, voire d'élevages dans leur ensemble. Un moyen de limiter ce coût serait de réaliser des PCR sur des mélanges de fèces provenant de plusieurs animaux. La question se posant alors est celle de l'évolution des performances de ce test diagnostique, notamment en termes de sensibilité.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse d'exercice vétérinaire ont donc pour objectif de caractériser les performances de la qPCR sur fèces, lorsque celle-ci est appliquée à des mélanges d'échantillons. La réalisation de tels mélanges est vue comme étant l'une des clés permettant une généralisation de l'utilisation de la qPCR sur le terrain, conduisant à un meilleur suivi sanitaire de la contamination par Map dans les troupeaux caprins.

Notre travail présente une continuité avec les expériences menées dans le cadre de la thèse du Docteur vétérinaire Marie Bartoli (Toulouse, 2017). En effet, celle-ci s'est intéressée aux conditions de mise en œuvre des qPCR sur mélanges de fèces dans l'objectif de préserver la sensibilité du test. Ainsi, des qPCR sur fèces ont été réalisées, de façon individuelle pour 5 brebis (3 fortes excrétrices et 2 faibles excrétrices) et 1 chèvre, puis sur des mélanges correspondant à des dilutions de ces mêmes échantillons au 5e, 10e et 20e (utilisation de fèces de brebis Lacaune indemnes pour la dilution). Les mélanges étaient alors réalisés manuellement, à partir d'une phase solide. Les résultats ont permis de mettre en évidence une perte majeure de sensibilité pour les mélanges de plus de 10 échantillons. Nous avons de ce fait restreint notre étude à des mélanges de dix échantillons au maximum. De plus, l'impact de la quantité de fèces prélevée pour la réalisation des mélanges a été étudié, avec une comparaison

des prélèvements de 3g et 10g. Les résultats indiquaient que la réalisation de mélanges à partir de 10g de fèces était à l'origine d'une plus grande variation des résultats (augmentation des coefficients de variation). De plus, les résultats étaient plus hétérogènes pour les mélanges constitués à partir de fèces issus d'animaux faibles excréteurs. La principale hypothèse alors soulevée était liée à la difficulté d'obtention d'un mélange de fèces homogène, ceci pouvant être amplifié lorsque la quantité prélevée est augmentée. De ce fait, nous avons choisi d'une part, de travailler avec des prélèvements de 5g pour des mélanges suivant le même protocole en phase solide, et d'autre part d'évaluer l'intérêt d'une autre méthode de préparation des mélanges de fèces dans le but d'obtenir une meilleure homogénéité.

L'étude présentée dans ce rapport consistait à réaliser des mélanges de fèces de caprins issus d'élevages atteints de paratuberculose afin d'évaluer divers éléments. Plus précisément, les travaux ont été orientés selon 3 axes :

- Rechercher de potentiels inhibiteurs impactant la quantification.
- Comparer deux méthodes de préparation des échantillons avant l'extraction d'ADN : la première méthode (dite mélanges en phase solide), consistait à mélanger manuellement une masse prédéfinie de fèces d'un lot d'animaux. L'autre méthode (dite mélanges en phase liquide) consistait à mélanger un volume prédéfini de fèces réhydratées et homogénéisées dans de l'eau bidistillée.
- Evaluer la sensibilité de la qPCR sur fèces réalisée sur des mélanges d'échantillons par rapport à l'analyse individuelle.

II. Matériel et méthodes

II.1. Obtention des échantillons

Les échantillons utilisés sont des fèces de caprins, précédemment prélevées et utilisées dans le cadre des travaux de thèse du Docteur Vétérinaire Fanny Joye « Evaluation du niveau d'excrétion fécale de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans les élevages caprins vaccinés contre la paratuberculose » (Nantes, 2016). Ces échantillons ont été conservés dans des poches individuelles à -20°C. Tous sont issus d'élevages caprins laitiers de Poitou-Charentes. Ce département a vu la mise en place d'un plan de contrôle de la paratuberculose par le GDS en 2014, et l'échantillonnage réalisé par le Docteur Joye visait à évaluer l'efficacité de la vaccination par le vaccin Guidair®. Dans ce but, des animaux ont été prélevés dans des

élevages vaccinés et des élevages non vaccinés, et les manipulations n'ont utilisé qu'une partie des fèces prélevées. Nos manipulations ont utilisé le reliquat des échantillons issus des élevages non vaccinés, choisis et prélevés selon les modalités décrites dans les paragraphes suivants.

II.1.1. Sélection des élevages

Les élevages non vaccinés sélectionnés dans la thèse d'exercice du Dr Joye l'ont été sur la base de deux critères : d'une part, l'incidence clinique observée de la paratuberculose devait être supérieure ou égale à 2%. D'autre part, des analyses réalisées sur un échantillon aléatoire d'individus de l'élevage devait confirmer le diagnostic de paratuberculose. Les méthodes diagnostiques utilisées étaient nécropsique (entérite hypertrophiante et/ou lymphadénite caséuse, avec confirmation de la présence de Map par PCR et bactérioscopie) et/ou sérologique. Six élevages ont été initialement sélectionnés, notés de A à F, mais l'élevage E avait été exclu de l'étude car, s'il présentait une séroprévalence importante (20%, IC 95% [9% ; 31%]), l'incidence clinique annuelle était jugée trop faible (1%). Nous avons donc à notre disposition des échantillons de fèces issus de 5 élevages où la présence de paratuberculose était confirmée, avec présence d'une expression clinique et donc des niveaux d'excrétion variables.

II.1.2. Sélection des animaux

Les échantillons que nous avons utilisés provenaient de prélèvements individuels semi-aléatoires. Dans chaque élevage, 50 individus ont été prélevés, à raison de 10 par classe d'âge sur 5 classes d'âge. Ces dernières correspondaient aux années de naissance ("millésime") des individus, et sont explicitées dans le Tableau 6. Au sein de chaque classe d'âge, 10 chèvre en lactation ont donc été sélectionnées aléatoirement.

Tableau 6 : Description des classes d'âge, d'après Dr. Vet. Joye (2016, thèse d'exercice vétérinaire)

Numéro de classe	Age des animaux	Année de naissance (millésime)
C1	[1 an ; 2ans[2014 - 2015
C2	[2 ans ; 3 ans[2013 - 2014
C3	[3 ans ; 4 ans[2012 - 2013
C4	[4 ans ; 5 ans[2011 - 2012
C5	[5 ans ; 7 ans[2009 - 2011

Les matières fécales prélevées l'ont été directement dans le rectum des chèvres choisies, avec utilisation d'une paire de gant à usage unique.

II.1.3. Sélection des échantillons positifs

Après obtention des résultats de qPCR individuelles, certains des échantillons positifs ont été sélectionnés pour constituer les mélanges servant à nos expérimentations.

La comparaison des deux méthodes de préparation des échantillons avant extraction a été réalisée sur les échantillons identifiés comme provenant de caprins forts et faibles excréteurs. Des fèces provenant d'ovins faiblement excréteurs et déjà utilisées dans le travail de Marie Bartoli (2017) ont également été incluses à l'étude.

L'évaluation de la sensibilité de l'analyse par qPCR de mélanges de fèces obtenus en phase liquide a été réalisée à partir d'échantillons catégorisés comme provenant de caprins faibles excréteurs (cycle seuil de positivité noté « Ct » élevé). Ce choix a été fait sur la base du seuil calculé par le logiciel dédié de l'amplificateur. Les échantillons choisis devaient avoir un Ct compris entre 32 et 42 cycles, et une quantité de matières fécales suffisante pour réaliser les mélanges. Du fait du nombre réduit d'échantillons correspondant à ces critères (27 échantillons individuels de chèvres différentes), certains échantillons ont été utilisés dans plusieurs mélanges, ce qui a par ailleurs permis d'augmenter le nombre final d'échantillons amplifiés.

II.1.4. Echantillons négatifs

Les échantillons négatifs utilisés pour la réalisation des mélanges provenaient de différentes sources. Les échantillons négatifs de fèces caprins étaient issus de chèvres d'expérimentation de l'équipe de parasitologie de l'UMR INRA-ENVT 1225 IHAP, testées individuellement en qPCR sur fèces. Les échantillons négatifs de fèces ovins étaient issus de brebis Lacaune d'un troupeau indemne de paratuberculose (INRA Lafage).

II.2. Protocole

Chaque échantillon individuel a été soumis à un protocole comprenant une phase de réhydratation, de concentration, de broyage, d'extraction, de purification et enfin

d'amplification. A l'exception de la phase de préparation des échantillons, les mélanges de fèces ont fait l'objet de la même méthodologie.

II.2.1. Préparation des échantillons individuels

A partir des échantillons individuels initiaux préalablement décongelés, une quantité de 5g de fèces a été prélevée, et placée dans 35 ml d'eau bidistillée dans des tubes FALCON ND pendant une nuit.

Le lendemain matin, les échantillons étaient vortexés, puis laissés à sédimenter pendant 20 minutes. S'ensuivait la récupération de 10 ml de surnageant, qui étaient ensuite filtrés sur ADIAFILTER ND.

Le filtrat obtenu était centrifugé (5 minutes, 3000g) et le surnageant jeté, ne laissant dans le tube qu'un culot de centrifugation. Celui-ci était alors remis en suspension avec 500µL d'eau bidistillée, et l'ensemble transféré dans un microtube contenant 300mg de microbilles de verre de 150 à 250 µm (Silibeads, Sigmund Lindner), afin de subir une étape de broyage (3x30s 6800rpm Precellys 24®, Bertin Technologies).

Les tubes étaient enfin centrifugés (5 minutes, 1500g) pour récupération de 100µL de surnageant et mise en plaque de 96 puits (Deepwell ND) en vue de l'extraction. A cette occasion, une plaque conservatoire était préparée avec 100µL de surnageant supplémentaire.

Les plaques ont ensuite été conservées à -80°C avant la réalisation des étapes suivantes.

II.2.2. Réalisation des mélanges

Mélanges « liquides » :

Des mélanges dits « liquides » ont été réalisés dans deux cadres :

- D'une part, dans le but de comparer les résultats de qPCR sur des mélanges en phase liquide et des mélanges en phase solide. Pour cela, 6 échantillons caprins ont été sélectionnés, dont 3 forts excréteurs ($C_q < 27$ cycles) et 3 faibles excréteurs ($C_q \geq 30$ cycles), ainsi que deux échantillons d'ovins faiblement excréteurs. Pour chaque échantillon, des mélanges au 1/10 ont été réalisés, et ont permis l'obtention de 16 ou 18

points de qPCR par échantillon, répartis sur deux plaques d'amplification. Chacun de ces échantillons a aussi été utilisé pour la préparation de mélanges en phase solide.

- D'autre part afin d'évaluer la sensibilité de détection de la qPCR en mélange de fèces en phase liquide. Pour ces manipulations, quatre-vingt-dix mélanges ont été construits :
 - 18 mélanges comprenant 1 échantillon positif dans un total de 5 échantillons, notés 1/5
 - 18 mélanges 1/10
 - 27 mélanges 2/10
 - 18 mélanges 2/5
 - et 9 mélanges 4/10.

Chaque mélange ainsi constitué a été testé en duplicata par qPCR, soit un total de 180 puits répartis sur deux plaques d'amplification

Chaque mélange a été préparé à partir de 10 g de fèces individuelles ayant subi l'étape de réhydratation, selon le protocole présenté Figure 2. Les mélanges ainsi réalisés ont alors été soumis à l'étape de filtration puis aux étapes suivantes, et ce en autant d'itérations indépendantes que son volume le permettait.

Mélanges « solides » :

Les mélanges dits solides ont été préparés à partir d'échantillons individuels de statut connu. Une quantité de 5g de fèces a été prélevée dans chacun des 5 à 10 échantillons de statut préétabli. Ces prélèvements ont ensuite été délités et écrasés à l'aide d'un abaisse-langue en bois à usage unique, puis mélangés ensemble dans un pot de prélèvement à l'aide d'un nouvel abaisse-langue, afin d'obtenir un mélange solide où la proportion d'éléments individuellement positifs était connue. Le mélange ainsi réalisé a alors été soumis à l'étape de réhydratation puis aux étapes suivantes en autant d'itérations indépendantes que son volume le permettait.

Les mélanges solides ont été réalisés dans le but de comparer les résultats de qPCR entre des mélanges en phase liquide ou en phase solide. Ces derniers ont été réalisés à partir des mêmes échantillons ovins et caprins que ceux utilisés pour les mélanges en phase liquide pour le même objectif.

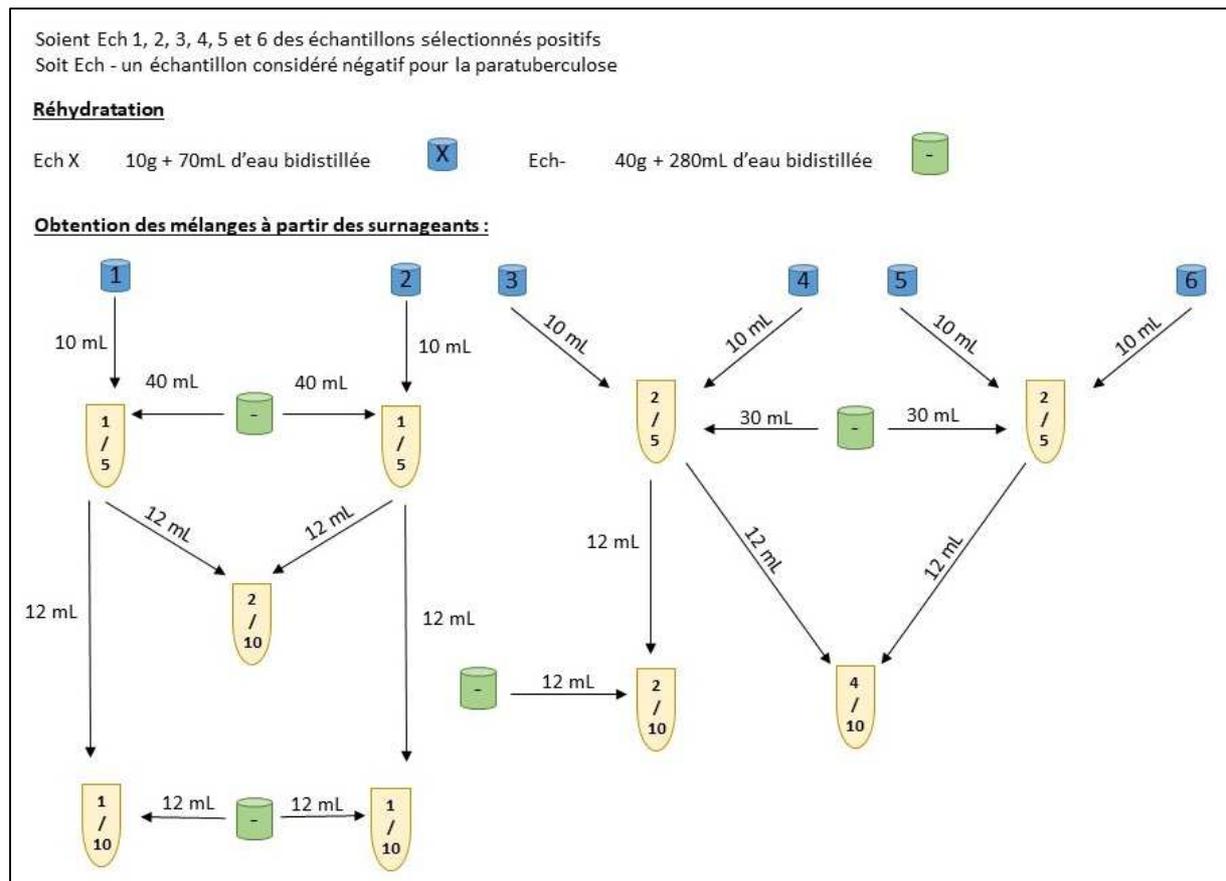


Figure 2: Protocole de constitution des mélanges en phase liquide

II.2.3. Extraction

L'extraction d'ADN de MAP à partir des échantillons préparés à cet effet a été réalisée à l'aide du kit d'extraction NucleoMag 96 (R) Tissue (Macherey Nagel) au laboratoire d'immunologie de l'UMR INRA-ENVT 1225 IHAP (Interactions Hôtes Agents Pathogènes). Ce kit peut être utilisé sur les fèces de ruminants pour l'extraction de *Mycobacterium avium spp. paratuberculosis* par un système de billes magnétiques. Il a été utilisé en conjonction avec l'automate d'extraction KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific), avec lequel il est compatible.

Le protocole d'extraction est détaillé en annexe 1. Brièvement, les échantillons à analyser sont mis en présence d'un tampon T1 contenant des protéinases K. Un contrôle d'extraction, fourni par le Kit Adiavet™ Paratb Real Time (Biox) est ajouté dans chaque puits de la plaque. L'ADN extrait des cellules est ensuite couplé à des billes magnétiques dont l'association est favorisée par un milieu MB2 (Sodium perchlorate 20 – 40% + éthanol 35 – 55%). Afin de ne conserver que l'ADN, des milieux de lavage sont utilisés, notés MB3 et MB4 (Sodium perchlorate 5 –

20% + éthanol 20 – 35%). Après une dernière étape de lavage à l'éthanol à 80°, l'ADN est placé dans un milieu d'élution noté MB6 puis conservé à -80°C.

II.2.4. Amplification

L'amplification a été réalisée à l'aide du kit Adiavet™ Paratb Real Time (Biox) Celui-ci contient une solution d'amplification A5, contenant des polymérase, des amorces spécifiques au segment IS900 et les nucléotides nécessaires à l'amplification. Cette solution est ajoutée aux échantillons avant analyse par le LightCycler 96® (Roche Life Science).

Pour chaque plaque, deux puits ont été attribués à des contrôles négatifs (eau microfiltrée), et deux puits pour des contrôles positifs (Para Positif Control contenu dans le kit Adiavet)

L'amplification elle-même a été réalisée par l'appareil LightCycler® 96, et consistait en plusieurs étapes : préincubation à 50°C pendant 120 secondes, dénaturation à 95°C pendant 600 secondes, amplification sur 50 cycles en deux étapes - 95°C pendant 30 secondes puis 60°C pendant 60 secondes, refroidissement à 40°C pendant 30 secondes.

II.2.5. Réalisation de gammes de dilution

Afin de pouvoir quantifier la quantité de Map présente dans les échantillons, des analyses de gammes ont été réalisées. L'objectif était de soumettre des échantillons, dont les concentrations sont connues, au protocole de PCR. Les valeurs seuil Cq obtenues permettent ainsi l'élaboration d'une régression log-linéaire aboutissant à une quantification de Map.

Le premier point standard d'une gamme correspondait à 10^7 génome de Map. A partir de celui-ci, des dilutions au dixième, à l'eau bidistillée ont été exécutées successivement jusqu'au point 10^1 . La réalisation de ces points est dépendante de paramètres connus :

- Nombre de nucléotides de l'ADN de Map = 4 829 781 (Rathnaiah et al. 2017)
- Masse molaire moyenne d'un nucléotide = 330 g/mole
- Nombre d'Avogadro N = $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules/mole
- Solution mère = 200 ng de génome de Map / μ l

Cependant, suite à une quantification réalisée par le laboratoire Trinean a posteriori, cette concentration mère s'est avérée être une solution pure du segment IS900 à 305,63 ng/μL. De nouveaux calculs des concentrations, à l'aide de ces données, permettent toutefois de toujours déterminer la quantité de bactéries sur la base d'une répétition de 14 à 18 segments IS900 dans le génome de Map (Donaghy, Johnston, et Rowe 2011, Ricchi et al. 2016). Les correspondances entre les quantités initiales et corrigées sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7: correspondance entre les points de gamme et la quantité de copies IS900

Point de gamme	Quantité de génomes de Map voulue par point de gamme (5μl)	Quantité de fragments IS900 réelle par point de gamme (5μl)
1	10 ⁷	5,077.10 ¹⁰
2	10 ⁶	5,077.10 ⁹
3	10 ⁵	5,077.10 ⁸
4	10 ⁴	5,077.10 ⁷
5	10 ³	5,077.10 ⁶
6	10 ²	5,077.10 ⁵
7	10 ¹	5,077.10 ⁴

Après amplification d'une gamme, la différence attendue de cycles seuils entre deux points séparés d'un facteur 10 est de 3,33 cycles environ, selon l'efficacité de l'amplification.

Par la suite, le principe des gammes a été utilisé dans le but de déterminer l'influence des constituants des fèces sur les paramètres de la qPCR. En effet, la littérature fait état d'inhibiteur de la PCR dans les fèces (Acharya et al. 2017) rendant primordiales la qualité des étapes d'extraction et purification d'ADN. Pour cela, des gammes ont été réalisées en utilisant une proportion variable d'éléments négatifs.

- Pour les mélanges 90/10, le point 10⁵ de la gamme standard a été utilisé en le diluant par 10 avec un extrait purifié de fèces ovin ou caprin. Quatre points 10⁴ ont ainsi été obtenus (2 dilués avec un échantillon négatif ovin et 2 dilués avec un échantillon négatif caprin). Les points de dilution suivants sont réalisés avec de l'eau bidistillée.
- Pour les mélanges 75/25, un échantillon à 4.10⁴ molécules de génome a été préparé en mélangeant 100μl de 10⁵ standard avec 150 μl d'eau. Le point 10⁴ a alors été obtenu en mélangeant 25μl de cet échantillon avec 75μl d'un extrait purifié de fèces ovin ou caprin

(deux points pour chaque espèce). Les points de dilution suivants ont été réalisés avec de l'eau bidistillée.

II.3. Obtention des résultats

L'amplification aboutit à l'obtention de données, recueillies dans le logiciel intégré au LightCycler® 96 (LC96). Ainsi, l'automate permet l'obtention de courbes d'amplification, indiquant la quantité d'ADN détectée au cours des cycles d'amplification (exemple de courbes Figure 3). Cette détection est possible grâce au marqueur de fluorescence « FAM ». Un autre marqueur, nommé « Hex » permet de valider l'étape d'extraction de l'ADN réalisée précédemment. Seul un résultat ayant deux courbes FAM et Hex pourra donc être considéré comme interprétable.

En complément, le logiciel fournit un tableau comprenant les valeurs de Cq, Slope (la pente), EPF (Endpoint Fluorescence) et détermine si l'échantillon est jugé négatif ou positif (noté « Call »)

Une première analyse des résultats a consisté à comparer le "call" du logiciel d'interprétation et les graphiques de courbes d'amplification obtenues, afin d'écartier les échantillons enregistrés comme positifs et fournissant un cycle seuil (Cq) mais présentant des courbes aberrantes.

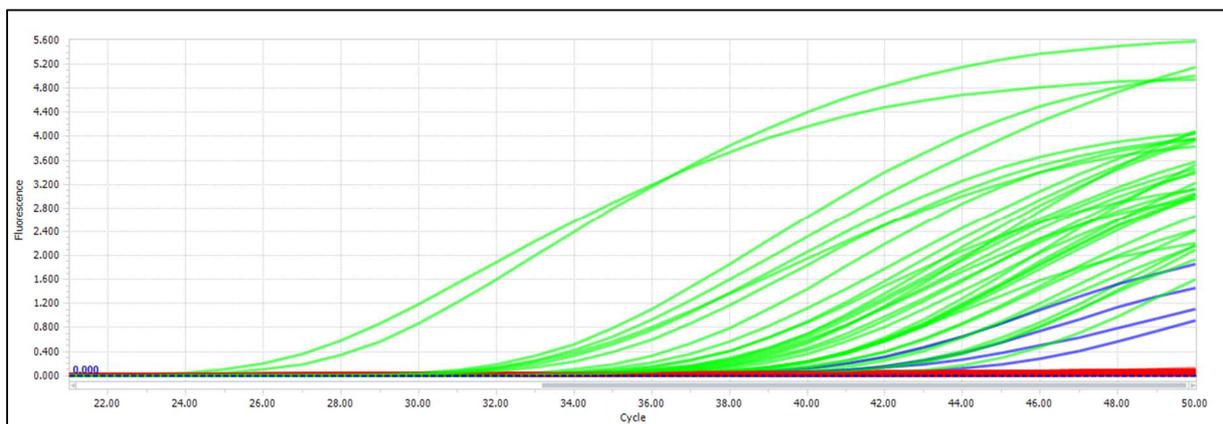


Figure 3: Courbes de réplification obtenues par LightCycler 96

Les courbes vertes correspondent aux profils positifs, les rouges sont quant à elles négatives. Entre les deux, en bleu, sont retrouvés les échantillons jugés positifs par LC96 mais dont l'amplification débute tardivement avec une sigmoïde dont le point d'inflexion est mal défini. Ces derniers sont jugés comme étant des faux positifs.

L'algorithme décisionnel de LC96 n'étant pas accessible, il est difficile de juger de la pertinence des critères de positivité. Il a donc été décidé de procéder à une sélection par un algorithme connu, afin de confronter les résultats. Les données brutes de fluorescence cycle par cycle ont été analysées à l'aide du package qpcR (Spiess 2018) du logiciel R (R Core Team. R, s. d.), et une seconde analyse a été effectuée, en recalculant les Cq pour obtenir de nouveaux cycles seuils, notés Ct.

Finalement, un échantillon a été considéré comme positif s'il répondait aux conditions suivantes :

- Call LC96 : positif
- Vérification visuelle de la courbe d'amplification : absence de profil aberrant
- Cq < 40 (recommandation du fabricant)
- Efficacité calculée de l'amplification (package qpcR) > 1,3

III. Résultats

III.1. Gammes

Les résultats obtenus sur cinq gammes en termes de Cq et de Ct sont exposés dans le Tableau 8. Les résultats sont apparus variables d'une gamme à l'autre et d'un manipulateur à l'autre, avec des coefficients de variations compris entre 8 et 35%.

Tableau 8: Cycles seuils obtenus selon les gammes

Gamme	Opérateur	Plaque	Nombre de points	Cq ou Ct	Ecart moyen	Ecart type	Coefficient de variation (%)
A	1	1	4	Ct	3,22	0,91	28,33
				Cq	3,29	0,81	24,65
B	2	2	4	Ct	3,55	0,28	7,96
				Cq	3,55	0,16	4,61
C	2	3	7	Ct	3,45	0,68	19,68
				Cq	3,78	1,94	51,38
D	2	3	7	Ct	3,24	0,25	7,86
				Cq	3,20	0,48	15,12
E	1	3	6	Ct	3,12	0,54	17,39
				Cq	3,00	0,66	22,07

La gamme D est celle pour laquelle l'écart moyen entre 2 points de dilution est le plus proche de l'écart attendu (3,24), et pour laquelle la dispersion des écarts moyens des Ct entre dilutions est la plus faible (CV : 7,86%) (écarts moyens des Cq = 3,20, CV : 15,12%). Elle a donc été jugée comme la série la plus fiable pour servir d'étalonnage et de quantification.

Une régression linéaire appliquée à cette gamme, exprimant le Cq ou le Ct d'un point de gamme en fonction du logarithme du nombre de copies IS900 avant amplification (N_0) permet d'obtenir le résultat présenté dans la Figure 4. La corrélation est bonne entre ces deux paramètres ($r^2=0,9985$ pour les Ct et $r^2=0,9973$ pour les Cq).

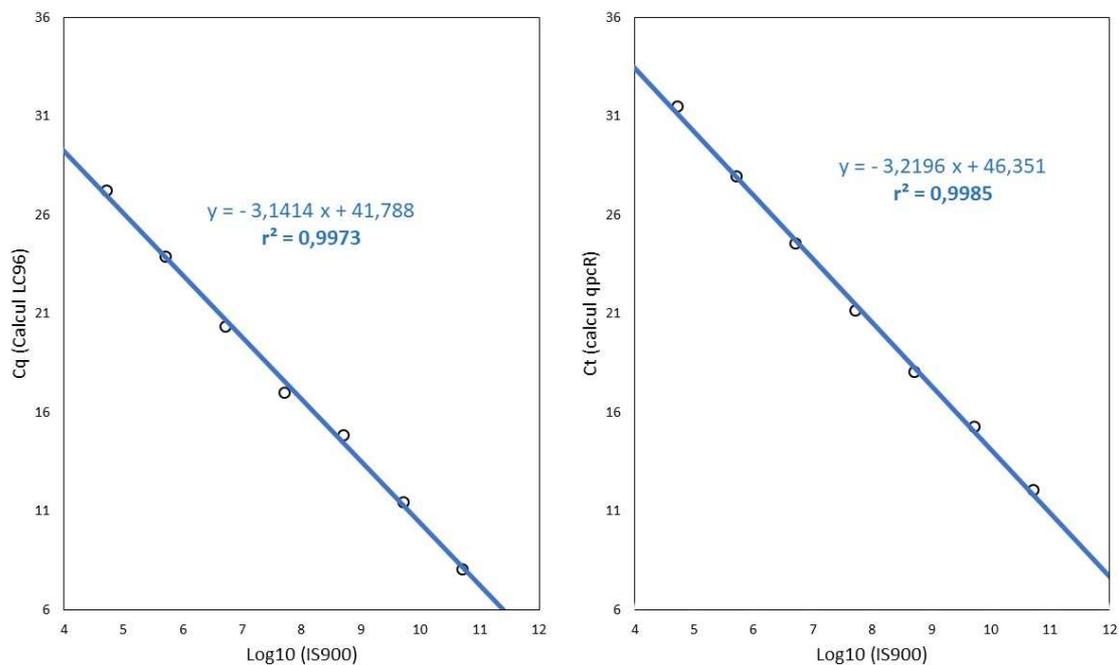


Figure 4: Régression linéaire de $Cq=f(\text{Log}(\text{IS900}))$ (gauche) et $Ct=f(\text{Log}(\text{IS900}))$ (droite)

Cela permet d'exprimer que, d'après nos résultats :

$$Cq = - 3,1414 \times \log(\text{IS900}) + 41,788$$

et

$$Ct = - 3,2196 \times \log(\text{IS900}) + 46,351$$

Dans cette situation, le plus haut cycle pouvant être observé est celui pour lequel le puits d'amplification ne comprend qu'une seule copie du gène IS900, c'est à dire $\text{IS900} = 1$, donc : $Cq = 41,788$ cycles ou $Ct = 46,351$ cycles.

III.2. Evaluation de la présence d'inhibiteurs d'amplification dans les fèces

A l'issue de l'amplification des points de gamme dilués dans des fèces négatives (ovins ou caprins) ou de l'eau bidistillée, nous avons pu obtenir les cycles seuils Cq et Ct de chaque échantillon, les premiers étant résumés dans le Tableau 9.

Les résultats obtenus pour la gamme pure (dilution dans de l'eau bidistillée) et les gammes diluées dans différentes quantités de fèces sont très proches et diffèrent de l'ordre d'environ un cycle (moyenne = 0,724 cycles, minimum = 0,085 cycles, maximum = 1,925 cycles), dans un sens ou dans l'autre.

Tableau 9: Résumé des calculs sur les Cq obtenus après amplification

Protocole		Eau bidistillée	Fèces négatives 90/10		Fèces négatives 75/25	
			Caprins	Ovins	Caprins	Ovins
10 ⁴	Moyenne	16,705	17,373	17,318	17,173	17,195
	Ecart type	0,355	0,193	0,119	0,090	0,061
	CV (%)	2,1	1,1	0,7	0,5	0,4
10 ³	Moyenne	20,200	19,688	20,573	19,890	20,585
	Ecart type	0,050	0,225	0,658	0,246	0,353
	CV (%)	0,2	1,1	3,2	1,2	2,0
10 ²	Moyenne	24,190	23,100	24,275	23,630	23,255
	Ecart type	0,156	0,692	0,736	0,195	0,220
	CV (%)	0,6	3,0	3,0	0,8	0,9
10 ¹	Moyenne	27,04	25,110	27,993	26,220	25,635
	Ecart type	0,175	0,923	0,623	0,740	0,842
	CV (%)	0,6	3,7	2,2	2,8	3,3

Etant donné le faible nombre de résultats par groupe (duplicatas pour la dilution dans l'eau bidistillée, quadruplicats pour la dilution dans les fèces négatifs), cela ne signifie pas pour autant qu'une telle différence n'existe pas.

Les coefficients de variation (CV) sont globalement plus faibles pour la gamme pure (0,6 %), que pour les dilutions dans les fèces (0,4% à 3,7%), à l'exception du point 10⁴.

Néanmoins, les Cq observés restent proches d'une gamme à l'autre. Cela laisse supposer que d'éventuels inhibiteurs de la qPCR restant après extraction n'impacteraient pas le comportement

des échantillons vis à vis de la régression linéaire réalisée à partir d'une gamme diluée dans l'eau bidistillée.

III.3. Analyses des échantillons individuels

Le logiciel du LC96 a identifié 94 échantillons individuels positifs à l'issue de l'amplification. La Figure 5 représente la répartition graphique des échantillons en fonction du cycle seuil de positivité d'une part (Cq) et de la pente au point d'inflexion d'autre part (Slope). Cette représentation permet de mettre en évidence trois populations d'échantillons :

- Les échantillons avec un Cq faible et une pente au point d'inflexion supérieure à 0,3, contenant les plus grandes quantités d'ADN initiales, que nous avons identifiés comme issus des individus fortement excréteurs au moment du prélèvement.
- Les échantillons avec un Cq élevé (>30) et une pente au point d'inflexion semblable au premier groupe (entre 0.25 et 0.4). Ces échantillons sont soit positifs (Cq=<40) soit négatifs (Cq >40).
- Les échantillons avec des Cq élevés (>35) et des pentes de valeur faible (<0.25). Ce groupe rassemble les échantillons nécessitant une évaluation visuelle de la courbe, pour éliminer les échantillons considérés comme positifs mais présentant des courbes d'amplification aberrantes ou douteuses.

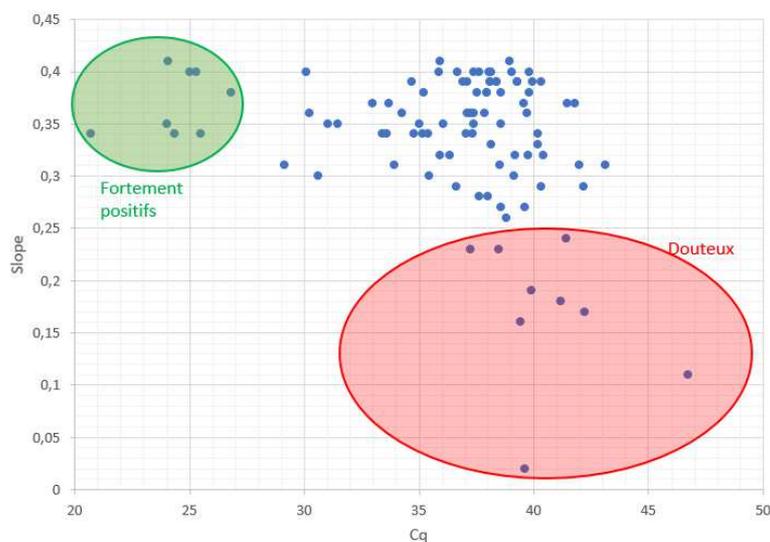


Figure 5: Représentation graphique des échantillons positifs sous LC96

Après exploitation graphique des résultats d'amplification et élimination des résultats aberrants ou douteux, 86 échantillons ont été considérés comme positifs.

En parallèle de cette sélection, les résultats bruts de fluorescence en temps réel ont été traités sous R afin de fournir une exploitation des résultats dont la méthode de calcul était connue, contrairement à l'algorithme décisionnel de LC96. Le traitement des données par le package qpcR a conduit à l'obtention d'une nouvelle série de données, avec notamment de nouveaux cycles seuils, nommés Ct sous R. Nous avons procédé à une comparaison des Ct et des Cq obtenus. La Figure 6, exprimant les Ct des échantillons positifs en fonction des Cq, indique une corrélation forte entre les deux séries de résultats ($R^2=0,9969$).

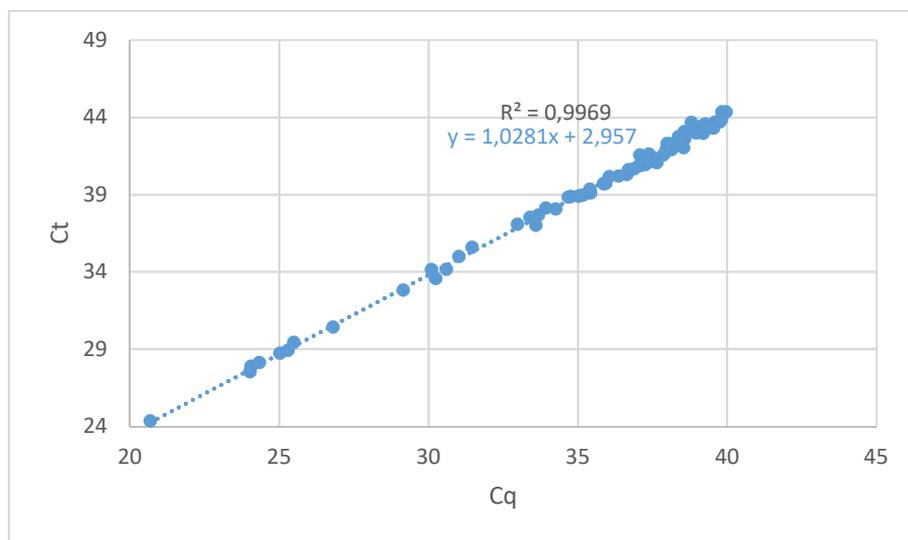


Figure 6: Corrélation entre les Cq (LC96) et les Ct (R)

Les valeurs de Ct étaient toujours supérieures à celles des Cq. Les écarts entre Ct et Cq pour un échantillon donné suivaient une répartition assimilable à une loi normale, et la moyenne de l'écart a été estimée à 3,952 (intervalle de confiance à 95% : 3,884 - 4,019) avec un coefficient de variation moyen de 2,25%.

Disposant de paramètres précis et fiables concernant les courbes d'amplifications, nous avons procédé à une sélection finale des échantillons, afin d'établir une liste de ceux certainement positifs. Cette sélection repose sur les quatre critères précédemment évoqués.

Au final, à partir de 248 échantillons individuels analysés, 94 étaient considérés comme positifs à partir de l'analyse fournie par l'algorithme du LC96. Sur ces 94 échantillons, 8 présentaient

des courbes et des pentes au point d'inflexion aberrantes, tous avec un Cq supérieur à 38 et ont finalement été considérés comme négatifs, conduisant à un total de 86 échantillons conservés sur la base des résultats bruts de l'amplification. Parmi ces derniers, 10 de plus ont été éliminés sur la base d'un Cq élevé, supérieur à 40. 76 échantillons individuels ont donc finalement été considérés comme positifs, soit une prévalence apparente de 30,8% sur les 248 échantillons. Les 172 autres échantillons ont été considérés comme négatifs, mais n'ont pas été utilisés comme tels pour la réalisation des mélanges du fait d'un risque résiduel de résultats faussement négatifs.

La répartition des Cq au sein de ces 76 échantillons est représentée dans la Figure 7. De nouveaux, l'existence de quelques animaux forts excréteurs parmi les individus prélevés peut être identifiée.

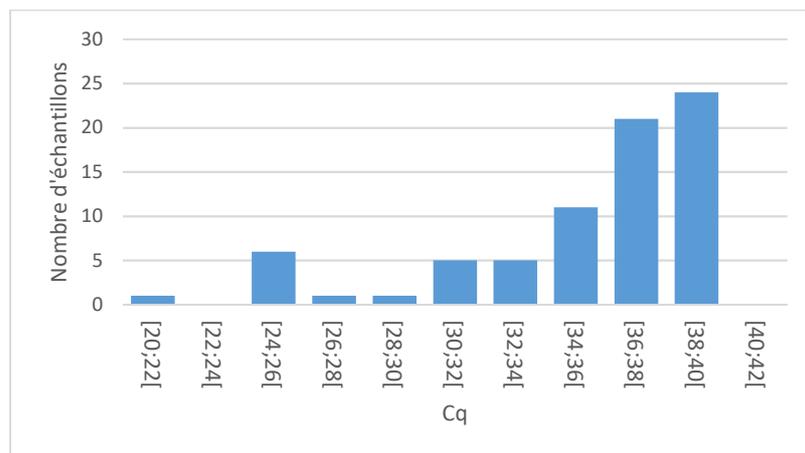


Figure 7: Distribution des échantillons en fonction du Cq

Par exploitation des résultats des gammes de dilution, il a été possible d'estimer la quantité de copies du gène IS900 initialement présentes dans le puits avant amplification. La prise en compte des facteurs de dilution liés aux manipulations réalisées lors de la préparation des échantillons de fèces, nous permet d'en déduire une concentration fécale de Map approchée, ou plutôt un intervalle de concentration fécale en fonction du nombre de copies d'IS900 dans le génome de la souche considérée (entre 14 et 18).

Le niveau d'excrétion moyen était de $2,5 \cdot 10^5$ bactéries par gramme de fèces, l'échantillon le moins concentré contenant 9,3 à 11 Map par gramme, tandis que le plus concentré contenait

entre $1,3.10^7$ et $1,7.10^7$ Map par gramme. Le seuil utilisé pour séparer les forts excréteurs des faibles excréteurs a été fixé au Cq de 30, soit entre $1,39.10^4$ et $1,79.10^4$ bactéries par gramme.

Ces catégories de faibles et forts excréteurs ont été ultérieurement utilisées pour sélectionner les échantillons à incorporer dans la réalisation des différentes séries de mélanges.

Après obtention de ces résultats individuels, nous avons cherché si la répartition des forts excréteurs et des faibles excréteurs au sein des élevages étudiés suivait une répartition similaire d'un élevage à l'autre.

Il ne semble pas y avoir de relation entre la prévalence des caprins forts excréteurs et la prévalence totale des animaux excréteurs (Figure 8). Notre population globale présentait un ratio faibles/forts excréteurs de 7,44, tandis que les élevages étudiés présentaient des ratios allant de 1 (élevage F, 2 forts excréteurs et 2 faibles, prévalence observée = 8%) à 23 (élevage A, 1 fort excréteur et 23 faibles excréteurs, prévalence observée = 50%).

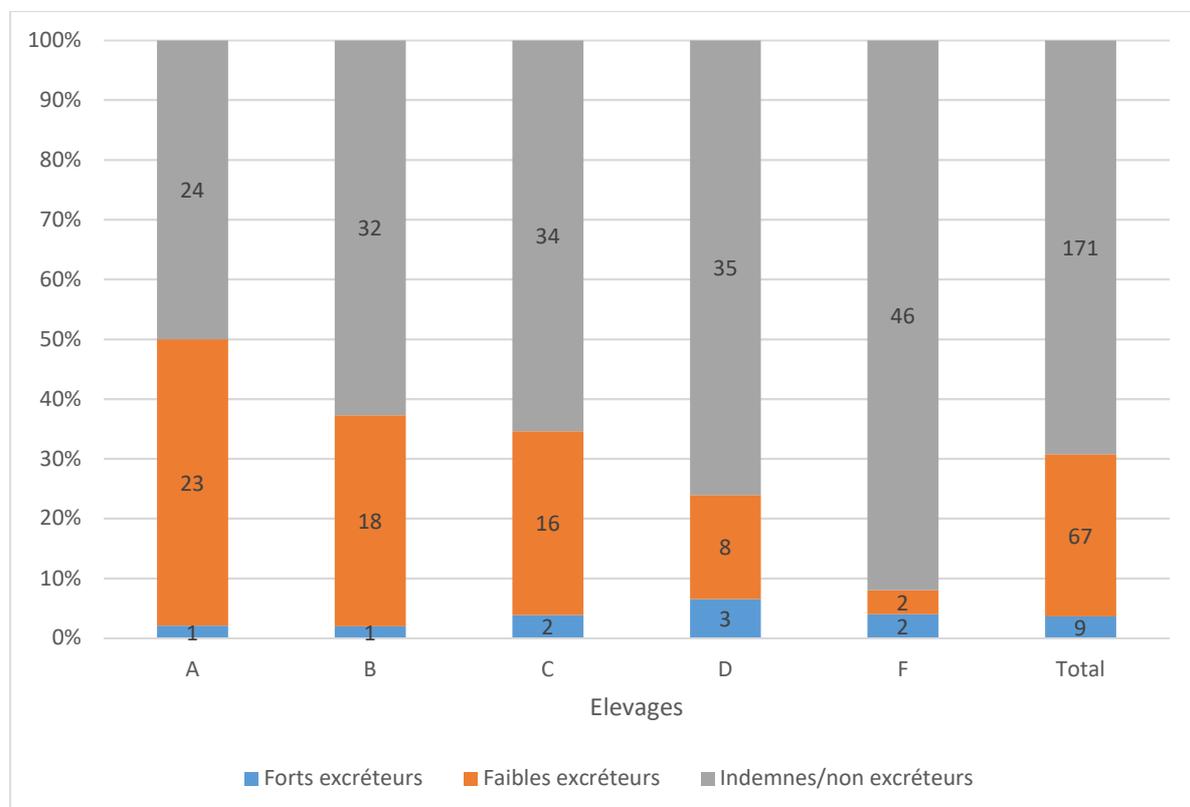


Figure 8: Répartition des individus testés selon l'élevage et le niveau d'excrétion

III.4. Comparaisons des deux méthodes de préparation des échantillons

Les résultats obtenus pour les qPCR des mélanges de taille 10 en phase solide et liquide sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10: Comparaison des méthodes de mélange, en Cq (calcul LC96, en haut) ou en Ct (calcul package qPCR, en bas)

Cq

Animal	Catégorie	Phase solide			Phase liquide			p value (Test de Mann-Whitney Wilcoxon)
		n	Moyenne Cq	CV (%)	n	Moyenne Cq	CV (%)	
C-9031	Caprins	9	32,64	2,89	9	30,1	2,15	1,60E-04 *
C-2037	Faibles	8	35,31	4,15	9	32,47	1,78	8,20E-05 *
F-4204	excréteurs	9	34,79	3,28	9	33,7	3,18	0,06
B-3824	Caprins	17	28,61	1,81	16	28,85	2,51	0,034
D-4118	Forts	18	27,07	1,71	16	25,47	2,34	1,48E-06 *
D-4185	excréteurs	18	28,68	2,85	16	27,03	2,01	1,45E-06 *
01406	Ovins	10	35,25	2,93	9	34,46	2,58	0,16
22562	Faibles Excréteurs	9	36,31	2,66	10	35,49	2,48	0,11

Ct

Animal	Catégorie	Phase solide			Phase liquide			p value (Test de Mann-Whitney Wilcoxon)
		n	Moyenne Ct	CV (%)	n	Moyenne Ct	CV (%)	
C-9031	Caprins	9	36,93	4,98	9	34,13	4,15	1,90E-03 *
C-2037	Faibles	8	39,61	4,36	9	36,62	1,79	8,20E-05 *
F-4204	excréteurs	9	39,13	3,2	9	37,98	3,35	0,08
B-3824	Caprins	17	31,95	3,33	16	32,23	5,39	0,77
D-4118	Forts	18	31,24	5,31	16	31,3	10,14	0,31
D-4185	excréteurs	18	32,54	5,43	16	31,91	6,8	0,40
01406	Ovins	10	39,55	2,87	9	38,74	2,4	0,16
22562	Faibles Excréteurs	9	40,91	2,44	10	39,88	2,39	0,035*

* Résultats significativement différents

Tous les mélanges de taille 10 analysés ont conduit à un résultat positif, qu'ils soient composés à partir de fèces d'animaux faibles ou forts excréteurs. Par ailleurs les coefficients de variation, variant entre 1,71% et 4,15% pour les Cq et entre 1,79% et 10,14% pour les Ct, sont globalement faibles pour l'ensemble des mélanges et les deux méthodes.

Des différences significatives sont cependant observées entre les deux méthodes.

Les cycles seuils sont globalement plus précoces pour les mélanges en phase liquide que pour les mélanges en phase solide.

D'autre part, l'analyse des résultats exprimés en Cq (avant analyse par R) permet d'identifier plus de couples différents que l'analyse des Ct. En particulier, lorsque les Cq sont utilisés, des différences significatives sont mises en évidence entre les méthodes de préparation pour les mélanges composés à partir des fèces de caprins forts excréteurs (B-3824, D-4118, D-4185). Ces différences ne sont plus significatives lorsque les Ct sont analysés. Ces différences pourraient s'expliquer par la dispersion plus importante des valeurs de Ct comparativement aux valeurs de Cq (coefficients de variation plus élevés). Une différence faiblement significative ($p=0,0499$) entre les coefficients de variation des Cq et Ct est en effet mise en évidence pour les mélanges solides. Cependant, l'analyse statistique ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les coefficients de variation associés aux deux méthodes de préparation autant en terme de Cq que de Ct (Test non-paramétrique de Mann-Whitney Wilcoxon, respectivement $p = 0,195$ et $p = 0,96$). Les coefficients de variation entre Cq et Ct pour la phase liquide ne semblent pas non plus se comporter selon des lois différentes ($p=0,083$). Ces résultats semblent indiquer que le traitement des résultats par R peut conduire à une dispersion plus importante des résultats qu'initialement observée.

III.5. Sensibilité de détection sur des mélanges en phase liquide

Chacun des 90 mélanges construits contenant au moins un échantillon de fèces positif, les pourcentages de mélanges détectés positifs par qPCR correspondent donc à la sensibilité analytique du test. Les résultats obtenus sont exposés Tableau 11. Chaque échantillon ayant été analysé en duplicata, les calculs de sensibilité ont été réalisés à partir de 180 points de qPCR.

Tableau 11: Résultats des analyses qPCR sur les mélanges de fèces en phase liquide

Type de mélange	1/5		1/10		2/5		2/10		4/10	
Résultat	Pos	Nég	Pos	Nég	Pos	Nég	Pos	Nég	Pos	Nég
Effectif	25	11	23	13	32	4	45	9	18	0
%	69,44 ^a	30,56	63,89 ^{b,c,d}	36,11	88,89 ^b	11,11	83,33 ^c	16,67	100,0 ^{a,d}	0,00
Total	36		36		36		54		18	

Pos : résultat positif ; Nég : résultat négatif

Test de Fisher a : $p\text{-value} = 9,88.10^{-3}$; b : $p\text{-value} = 0,0246$; c : $p\text{-value} = 0,0463$; d : $p\text{-value} = 0,0239$

Pour les mélanges de 10 échantillons, ces résultats indiquent une augmentation de la sensibilité du test lorsque le nombre d'échantillons positifs composant le mélange augmente. Cette augmentation n'est cependant pas statistiquement significative ($p=0,079$) pour les mélanges de 5 échantillons. De même, il n'y a pas de différence significative entre la sensibilité obtenue pour les mélanges contenant 2 échantillons positifs sur 10 et celle obtenue pour les mélanges contenant 4 échantillons positifs sur 10 (respectivement $Se_{2/10} = 83,33\%$ et $Se_{4/10} = 100,0\%$ p -value $=0,10$). Un manque de puissance, lié à l'effectif limité de mélanges analysés, est probablement à l'origine de cette absence de différence significative (puissance calculée, pour les effectifs de 54 et 18, 0,18). Un effectif de 42 échantillons analysés pour chaque modalité aurait été nécessaire pour que cette différence soit significative au seuil de 5%.

Par ailleurs, les sensibilités calculées pour les mélanges de 5 et 10 échantillons sont proches et ne sont pas statistiquement différentes.

En ce qui concerne la variabilité des résultats, 17 échantillons sur 90 (18.9%) ont conduit à un résultat différent entre les deux duplicatas. Le coefficient de variation moyen du Cq était de 1,63% en ne prenant en compte que les résultats non discordants, et 4,8% en prenant aussi en compte les résultats discordants (les échantillons négatifs selon LC96 ont été associés à une valeur arbitraire de 50 cycles pour le calcul des coefficients de variation). Les résultats obtenus selon les types de mélange réalisés sont présentés dans le Tableau 12:

Tableau 12: Variabilité des résultats de qPCR sur mélanges liquides réalisés en duplicatas

Mélange	Nombre d'échantillons en duplicata	Coefficient de variation moyen du Cq (%)	Nombre et (%) de duplicatas discordants
1/5	18	4,5	5 (27.8%)
1/10	18	8,8	5 (27.8%)
2/5	18	3,6	2 (11.1%)
2/10	27	3,9	5 (18.5%)
4/10	9	3,4	0 (0%)
Total	90	4,8	17 (18.9%)

Aucune tendance nette ne se dégage de ces résultats, cependant la variabilité au sein des duplicatas semble être corrélée négativement au nombre de positifs dans le mélange. Cette suspicion n'a pas pu être confirmée statistiquement.

Nous avons de plus cherché à évaluer les variations de résultats, d'une amplification à l'autre, d'un même échantillon de fèces. Dans ce but, nous avons déterminé, à partir d'un Cq obtenu sur mélange 1/10 ou 1/5, le Cq théorique que devrait avoir ce même échantillon sans dilution. Ces résultats ont alors été comparés aux Cq effectivement obtenus sur échantillons individuels. Grâce aux duplicatas réalisés, cela nous offre 2 à 4 mélanges à comparer pour chaque échantillon. Les résultats sont représentés Figure 9.

Il apparaît que les dilutions obtenues par mélanges 1/5 et 1/10 ne permettent pas de revenir avec précision à un Cq issu d'une qPCR individuelle. Par extension, l'analyse des mélanges n'offre pas la possibilité de quantifier la population bactérienne de l'échantillon d'origine. Toutefois, statistiquement, nous retrouvons un coefficient de variation de 63% entre les résultats issus d'un même individu. De plus, ce graphique permet de mettre en évidence une tendance à surestimer la quantification des échantillons lorsque le mélange correspond à une dilution au dixième.

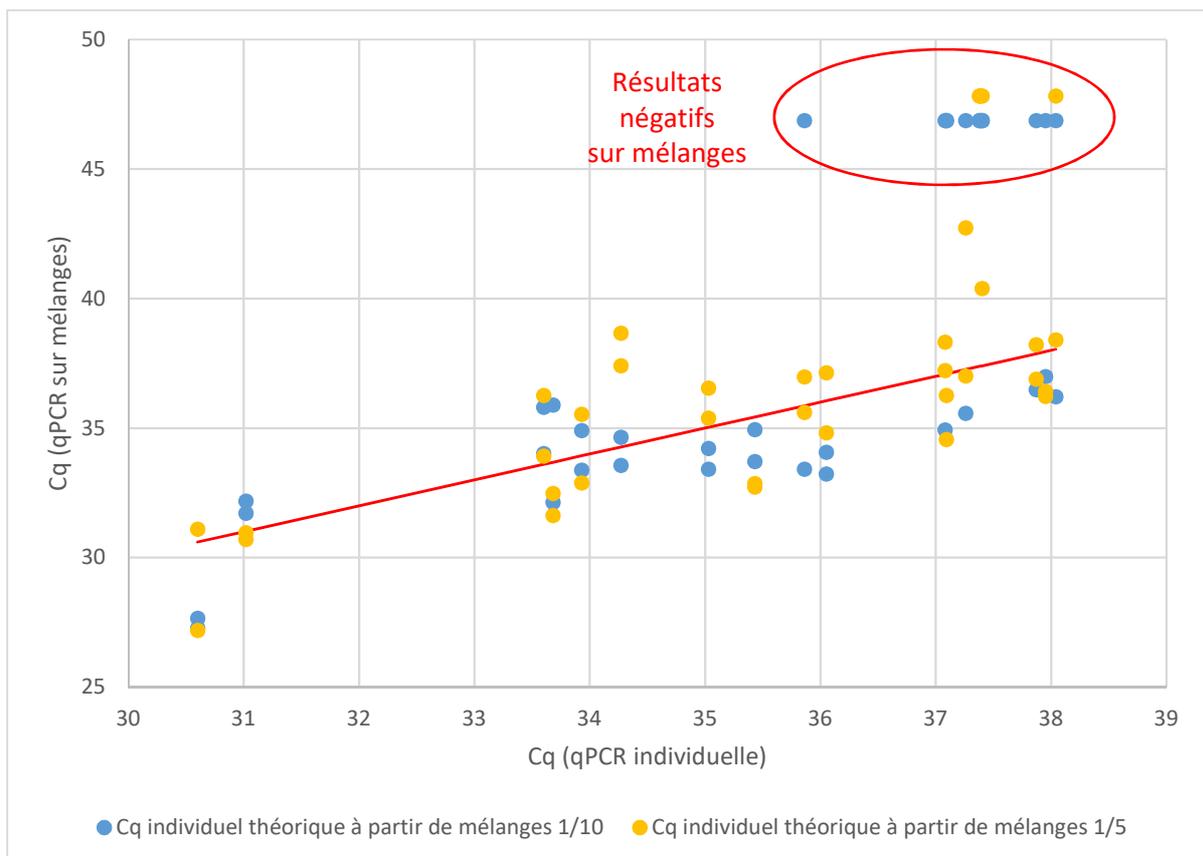


Figure 9: Comparaison des résultats de quantification individuelle et en mélange

La courbe rouge correspond à la situation où les quantifications après mélange seraient égales à la quantification individuelle.

IV. Discussion

L'objectif principal de cette étude était de comparer deux méthodes de préparation des échantillons avant leur analyse en mélanges par qPCR.

Par ailleurs, nous avons cherché à valider et préciser les estimateurs de sensibilité de la qPCR appliquée à des mélanges de fèces obtenus dans un précédent travail chez les ovins (Bartoli 2017).

Lors de son travail, Marie Bartoli (2017) avait noté une dispersion relativement importante des résultats lors de la réalisation de mélanges (appelés dilutions dans son manuscrit), avec jusqu'à 21,9% de coefficients de variation dépassant les 10%. Elle comparait cette dispersion à celle des résultats individuels (6,2% de coefficients de variation supérieurs à 10%). Dans notre cas, le coefficient de variation des résultats de mélange est en moyenne de 4,8%, avec une médiane à 2,6%. La moyenne des coefficients de variation est rehaussée par des valeurs hautes extrêmes, c'est-à-dire les 14 des 17 échantillons dont les duplicatas discordent, conduisant à un coefficient de variation supérieur à 10% (soit 15,6% de coefficients de variation >10%). Nous ne pouvons malheureusement pas comparer ces résultats à nos propres résultats individuels, que nous n'avons pas répété du fait du grand nombre d'échantillons (247) et de la nécessité de conserver des fèces pour les mélanges. Cependant, nous pouvons tout de même noter comme M. Bartoli que l'analyse par qPCR de mélanges de fèces semble sujette à des variations conséquentes, vraisemblablement du fait de l'hétérogénéité des mélanges en concentration de Map.

Nous avons travaillé sur des chèvres faiblement excrétrices, et obtenu des sensibilités de 63,89% et 69,44% pour les mélanges de 10 et 5 échantillons respectivement, et des sensibilités croissantes en augmentant le nombre d'échantillons positifs dans les mélanges. En travaillant avec deux brebis faiblement excrétrices, Marie Bartoli avait obtenu des sensibilités allant de 30 à 53% pour les dilutions au dixième, et de 50 à 100% pour les dilutions au cinquième, selon la quantité de fèces utilisée (3 et 10 grammes). Les résultats obtenus étaient très hétérogènes selon la brebis considérée, le niveau de dilution et la quantité de fèces utilisée.

Nos propres résultats témoignent d'une plus grande homogénéité, qui peut être attribuable à plusieurs causes. Nous avons considéré l'influence de la technique de mélange, selon une méthode sur phase liquide plutôt que solide, mais lorsque nous avons comparé nos résultats sur

ces deux méthodes, aucune différence n'est apparue. Nous avons aussi envisagé l'effet espèce, mais de la même façon les résultats obtenus chez les ovins et les caprins sont concordants. Les éléments que nous pouvons réellement envisager comme influençant l'homogénéité en comparant nos manipulations à celles du Docteur Bartoli concernent la méthodologie elle-même. En effet, contrairement à son travail où les manipulations étaient réalisées par trois personnes, seules deux étaient impliquées dans nos propres manipulations, et chacun réalisait les mêmes étapes pour chaque plaque de qPCR analysée. Les quelques mélanges solides que nous avons réalisés pourraient potentiellement avoir été mieux homogénéisés à la main avant prélèvement.

En terme d'homogénéité et de répétabilité des manipulations, nos résultats tendent à indiquer que, si les mélanges solides semblaient assez hétérogènes dans le travail du Docteur Bartoli, des mélanges solides sur 5g de fèces bien homogénéisés et des mélanges liquides sur 10g donnent des résultats similaires en termes de répétabilité.

Notre travail a de plus permis de préciser la variabilité des sensibilités de qPCR sur mélanges liquides. La sensibilité d'un test (Se) est la probabilité qu'un individu excréteur de Map au moment du prélèvement obtienne un résultat positif au test. Alors, la sensibilité d'une qPCR en mélange peut être définie comme la probabilité qu'un mélange comprenant au moins un échantillon contenant des Map, présente un résultat positif.

L'hypothèse de travail que nous avons utilisée était la suivante : lors d'une analyse par qPCR d'un mélange de fèces de n individus, le test est assimilable à une série de n tests indépendants. Chaque test vise à établir le statut d'un des échantillons constituant le mélange, avec la probabilité d'établir un faux positif estimée nulle (spécificité de la qPCR considérée comme parfaite). Si au moins l'un des n tests successifs est positif, alors le test global est positif.

Cela revient à dire que lors de l'analyse d'un mélange constitué de n individus dont k positifs, l'analyse est constituée de k épreuves de Bernoulli successives, de paramètre $Se_{1/n}$ (Sensibilité du test pour un mélange $1/n$).

Avec les mêmes définitions des variables que ci-dessus et avec :

- $Se_{k/n}$ la sensibilité du test sur un mélange de k positif(s) parmi n échantillons,
- X : une variable aléatoire suivant une loi binomiale de paramètre $(k, Se_{1/n})$, alors :

$$Se_{k/n} = \sum_{i=1}^k P(X = i) = \sum_{i=1}^k \binom{k}{i} Se_{1/n}^i (1 - Se_{1/n})^{n-i}$$

Ce qui peut s'exprimer plus simplement par l'inverse de l'événement contraire, la probabilité de ne détecter aucun des échantillons positifs du mélange :

$$Se_{k/n} = 1 - P(X = 0) = 1 - (1 - Se_{1/n})^n$$

Si l'on compare les résultats obtenus avec les résultats prédits, on obtient le tableau ci-dessous:

Tableau 13: Confrontation entre les sensibilités prédites et observées

Niveau de mélange	Sensibilité prédite	Sensibilité observée [IC 95 %]	Valeur p (Fisher)
1/5	NA	Se _{1/5} = 69,4 % [53,1 ; 82,0]	NA
2/5	Se _{2/5} = 1 - (1 - Se _{1/5}) ² Se _{2/5} = 1 - (1 - 0,694) ² = 90,6 %	Se _{2/5} = 88,89 % [74,7 ; 95,6]	0,34
1/10	NA	Se _{1/10} = 63,9 % [47,6 ; 77,5]	NA
2/10	Se _{2/10} = 1 - (1 - Se _{1/10}) ² Se _{2/10} = 1 - (1 - 0,639) ² = 87 %	Se _{2/10} = 83,33 % [71,3 ; 91,0]	0,79
4/10	Se _{4/10} = 1 - (1 - Se _{1/10}) ⁴ Se _{4/10} = 1 - (1 - 0,639) ⁴ = 98,3 %	Se _{4/10} = 100 % [82,4 ; 100]	1

Les sensibilités observées et prédites sont très proches et ne diffèrent pas statistiquement. Toutefois, le panel d'échantillons utilisé était restreint, notamment pour les mélanges « 4/10 » (18 mélanges disponibles). Afin d'obtenir des sensibilités plus pertinentes, les expériences entreprises devraient être répétées avec un panel d'échantillons plus grand.

Cependant, un élément important est à prendre en compte dans l'interprétation des résultats : à partir d'une sensibilité connue d'un mélange de n échantillons, dont un seul est positif, le modèle choisi permet de déduire celle d'un lot de même taille contenant plus de positifs. Ce modèle et nos résultats décrivent donc une évolution de la sensibilité relative à cette première valeur, et non la sensibilité que l'on pourrait obtenir dans une population réelle. En effet, une telle population réelle contient des individus indemnes, des individus faiblement excréteurs, des

individus fortement excréteurs, et des individus contaminés non excréteurs, alors que notre population testée ne contient que des faibles excréteurs et des individus indemnes.

Le fait que la sensibilité observée soit très proche de la sensibilité théorique, est en faveur de l'hypothèse d'indépendance des "événements positifs". Cela reviendrait à dire qu'il n'existe pas d'interaction entre les fèces issues d'individus différents et que la répartition des Map est globalement homogène après constitution de mélange en phase liquide.

Nous pouvons alors extrapoler nos résultats au comportement du test sur le terrain, dans le cadre du dépistage des individus faiblement excréteurs. En effet, le niveau de dilution des mélanges est assimilable sur le terrain à une prévalence en faibles excréteurs. Ces derniers sont les individus les plus fréquents parmi les infectés et les plus difficilement identifiables. Ils sont donc la clé de la maîtrise de cette pathologie dans l'élevage, en dehors de l'option d'éradication du troupeau.

A partir de ces résultats, il est donc possible de prévoir l'efficacité de la qPCR en mélange de fèces en fonction de la prévalence intra-troupeaux. Cela permettrait de juger de la pertinence de son emploi dans des élevages où la prévalence est plus ou moins forte (Mathevon 2018).

La comparaison des quantifications à partir des échantillons individuels ou après dilution au cinquième et au dixième (mélanges 1/5 et 1/10) montre des coefficients de variation moyens de 63%, avec une similitude des dispersions entre les tailles de mélange, traduisant une très forte variabilité des résultats pour un individu donné. Cette variabilité s'explique par la relation de type exponentiel entre le cycle seuil et la quantification, amplifiant la dispersion des résultats. À partir de ces données, nous pouvons estimer que la quantification par qPCR sur nos manipulations ne peut donner une indication de la concentration fécale en Map qu'à un ordre de grandeur de 10 près.

Cela est d'autant plus vrai qu'une caractéristique des colonies de Map peut faire sensiblement varier la concentration fécale dans deux prises d'un même prélèvement. En effet, une tendance à la formation d'agrégats bactériens a été notée *in vitro*, par exemple dans le cadre d'études sur les paramètres de croissance des colonies (Elguezabal et al. 2011) ou sur le comportement de

Map face aux traitements thermiques (Klijn, Herrewegh, et de Jong 2001). L'observation de tels agrégats *in vivo* a été confirmée par des observations microscopiques de fèces.

Ce comportement particulier a pour conséquence qu'une concentration fécale globale en Map se traduit en réalité par une répartition très hétérogène. Cela implique que plusieurs échantillons issus d'un même prélèvement peuvent contenir des quantités très variables de Map.

L'inclusion d'une gamme de dilution sur les mêmes plaques que les échantillons nous assure d'obtenir une courbe d'étalonnage prenant en compte l'efficacité de la qPCR, et améliore donc la fiabilité de la quantification. Cependant, la gamme d'étalonnage n'est pas soumise à la phase d'extraction, ce qui pourrait amener à une déviation entre les concentrations fécales de Map calculées et les concentrations réelles. D'après Chui et al. (2004), les méthodes d'extraction basées sur la formation de culots ADN-silice ou sur la liaison de l'ADN à des particules magnétiques, sont celles permettant la meilleure élimination de potentiels inhibiteurs de la PCR, en particulier la méthode magnétique (Chui et al. 2004).

En ce qui concerne la sensibilité en fonction de la méthode d'extraction, de nombreuses méthodes présentent des résultats semblables. L'étape déterminante dans la phase d'extraction semble plus liée à la méthode de lyse cellulaire utilisée, la sensibilité étant meilleure pour les kits utilisant une lyse par broyage que pour les kits utilisant une lyse par tampon (Leite et al. 2013). Ces résultats nous confortent dans le fait que la méthode utilisée dans nos manipulations fait partie des plus efficaces parmi celles recensées, couplant une lyse par broyage à une extraction magnétique.

Le protocole de PCR nécessite de déterminer un segment d'intérêt qui deviendra la cible de l'amplification. Dans le cas de *Mycobacterium avium* spp *paratuberculosis*, plusieurs segments spécifiques ont été déterminés avec notamment IS900, utilisé dans notre étude. Plusieurs auteurs ont cherché à comparer les performances de la PCR en fonction de la séquence d'amplification utilisée. Kruijf et al (2017) ont pour cela réalisé des PCR sur des échantillons de fèces inoculés avec 10^2 UFC/g d'une souche de Map, en utilisant les séquences IS_MAP04, IS_MAP02 et IS900. L'amplification a alors permis d'obtenir un résultat positif dans respectivement 83,0%, 83,9% et 85,8% (de Kruijf et al. 2017). La séquence utilisée semble donc tout à fait adaptée à la recherche du bacille de Johne par PCR. Cependant, d'autres études font état de résultats faussement positifs, dus à la présence de séquences IS900-like dans le génome d'autres mycobactéries dont *Mycobacterium scrofulaceum* (Cousins et al. 1999, Tasara, Hoelzle, et Stephan 2005). Toutefois, IS900 présente la particularité d'être intégrée

dans le génome de Map sous forme de séquences répétées entre 14 et 18 fois. Ce nombre de répétitions permet en effet d'augmenter la sensibilité de détection de la bactérie par rapport aux autres segments moins fréquents tels que IS-Map04, répété quatre fois ou IS-Map02, répété 6 fois dans le génome (de Kruijf et al. 2017) mais aussi hspX (Ellingson, Bolin, et Stabel 1998) et f57 (Li et al. 2005, Möbius et al. 2008).

La comparaison des résultats d'amplification de plusieurs concentrations d'ADN purifié de Map dilué dans de l'eau bidistillée et des fèces semble indiquer que l'impact de potentiels inhibiteurs d'amplification présents dans les fèces est négligeable... En conséquence, le rôle de potentiels inhibiteurs est probablement mineur dans une éventuelle différence de quantification entre la situation réelle et celle calculée.

Néanmoins, ces résultats posent une autre question. En effet, ils signifient aussi que, dans nos manipulations, diluer un échantillon contenant des copies IS900 avec de l'eau bidistillée ou de l'extrait de fèces négatif n'impacte pas les résultats ultérieurs d'amplification. En conséquence de quoi nous pouvons nous interroger sur les méthodes de dilution utilisées pour de futures manipulations. Il est possible de réaliser des mélanges comme nous l'avons fait, en prenant un échantillon de fèces positif et en le mélangeant avec 9 échantillons négatifs par exemple. Peut-être serait-il équivalent de diluer un échantillon positif extrait dans de l'eau bidistillée. Sans intérêt sur le terrain, cela pourrait cependant permettre de considérablement alléger des protocoles expérimentaux portant sur l'évaluation de la PCR appliquée à des mélanges d'échantillons, à condition d'utiliser une méthode de purification efficace.

Conclusion

La paratuberculose est une maladie enzootique contagieuse à l'origine de pertes économiques importantes. Une période d'incubation longue et une symptomatologie non spécifique, associée aux faibles valeurs informatives des tests diagnostiques ante-mortem, limitent l'efficacité des plans de dépistage et de maîtrise basés sur la seule identification et élimination des animaux détectés positifs. Dans les troupeaux de petits ruminants (ovins et caprins), les grands effectifs et la faible valeur économique des animaux limitent par ailleurs l'utilisation de tests de dépistage individuels à grande échelle. Il apparaît donc important de développer des approches diagnostiques à l'échelle collective à moindre coût, permettant d'évaluer la situation sanitaire globale des troupeaux (infectés ou à faible risque de l'être), voire de préciser la prévalence intra-troupeau de l'infection, afin de mieux orienter la prise de décision dans les plans de maîtrise et de prévention.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de ce travail étaient de comparer deux méthodes de préparation des mélanges de fèces sur les performances analytiques de la qPCR et d'évaluer la sensibilité analytique de la qPCR appliquée à des mélanges de fèces préparés selon l'une de ces méthodes.

Nos résultats indiquent que les deux méthodes de préparation (mélanges constitués directement à partir des fèces, dits mélanges en phase solide et mélanges constitués après réhydratation des fèces, dits mélanges en phase liquide) donnent des résultats globalement équivalents dans les conditions de nos expériences.

Par ailleurs, les résultats relatifs à l'estimation de la sensibilité analytique de la qPCR appliquée à des mélanges en phase liquide de fèces caprins confirment et complètent ceux obtenus dans d'autres travaux chez les ovins. Ces estimateurs, variant de 70% à 100% selon la taille et la composition des mélanges, indiquent que l'analyse de mélanges de fèces par qPCR dispose de performances satisfaisantes pour permettre la détection de prévalence d'infection relativement faible à l'échelle collective.

La réduction des coûts analytiques associée à la réalisation des analyses de mélanges permettraient la diffusion de cette méthode à plus grande échelle et ainsi de l'intégrer dans le cadre de programmes de dépistage et de suivi afin d'améliorer à la fois la maîtrise de la maladie

en élevages infectés mais aussi la sécurisation des échanges au travers de la certification de troupeaux à faible risque d'être infectés.

Bibliographie :

- Abendaño, Naiara, Lyudmila Tyukalova, Jesse F. Barandika, Ana Balseiro, Iker A. Sevilla, Joseba M. Garrido, Ramon A. Juste, et Marta Alonso-Hearn. 2014. « Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Isolates Induce in Vitro Granuloma Formation and Show Successful Survival Phenotype, Common Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Responses within Ovine Macrophages Regardless of Genotype or Host of Origin ». *PLoS One* 9 (8): e104238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104238>.
- Abraham, Asha, Thomas Naicy, Kunniyoor Cheemani Raghavan, Joseph Siju, et Thazhathuveetil Aravindakshan. 2017. « Evaluation of the Association of SLC11A1 Gene Polymorphism with Incidence of Paratuberculosis in Goats ». *Journal of Genetics* 96 (4): 641-46.
- ACERSA. 2005. « Référentiel technique d'une garantie de cheptel en matière de paratuberculose bovine ». Réf/PT/01-RévB - 5 pages.
- Acharya, Kamal R., Navneet K. Dhand, Richard J. Whittington, et Karren M. Plain. 2017. « PCR Inhibition of a Quantitative PCR for Detection of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis DNA in Feces: Diagnostic Implications and Potential Solutions ». *Frontiers in Microbiology* 8: 115. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00115>.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments. 2009. *Paratuberculose des ruminants*. Maisons-Alfort: Afssa.
- Alcedo, Karel P., Saisathya Thanigachalam, et Saleh A. Naser. 2016. « RHB-104 Triple Antibiotics Combination in Culture Is Bactericidal and Should Be Effective for Treatment of Crohn's Disease Associated with Mycobacterium Paratuberculosis ». *Gut Pathogens* 8: 32. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0115-3>.
- Arsenault, Ryan J., Pekka Maattanen, Joanna Daigle, Andrew Potter, Philip Griebel, et Scott Napper. 2014. « From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ». *Veterinary Research* 45 (mai): 54. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54>.
- As, Belo-Reis, Felipe Salvarani, Brito Mf, Fonseca Aa, Silva Ns, Silveira Jas, Reis Jkp, Jenevaldo Silva, Oliveira Cmc, et José Barbosa. 2016. « Intrauterine Infection by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in buffalo (Bubalus bubalis) ». *Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis* 1 (février): 3.

- Bastida, Felix, et Ramon A. Juste. 2011. « Paratuberculosis Control: A Review with a Focus on Vaccination ». *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 9 (octobre): 8. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-9-8>.
- Bauman, C. A., Andria Jones-Bitton, Jocelyn Jansen, David Kelton, et Paula Menzies. 2018. « Evaluation of Bulk Tank Milk PCR and Bulk Tank Milk Modified ELISA Tests for the Detection of Paratuberculosis at the Herd Level in Goat and Sheep Dairies in Ontario, Canada ». *Journal of Dairy Science*, octobre. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15020>.
- Begg, D.J., K. de Silva, N. Carter, K.M. Plain, A. Purdie, et R.J. Whittington. 2011. « Does a Th1 over Th2 Dominancy Really Exist in the Early Stages of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infections? » *Immunobiology* 216 (7): 840-46. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.12.004>.
- Ben Romdhane, Racem, Gaël Beaunée, Guillaume Camanes, Raphaël Guatteo, Christine Fourichon, et Pauline Ezanno. 2017. « Which phenotypic traits of resistance should be improved in cattle to control paratuberculosis dynamics in a dairy herd: a modelling approach ». *Veterinary Research* 48. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0468-8>.
- « Bulletin Officiel n°2003-48 ». 2018. 13 mai 2018. <http://solidarites-sante.gouv.fr/fichiers/bo/2003/03-48/a0483680.htm>.
- Cecchi, Francesca, Claudia Russo, Daniela Iamartino, Alessia Galiero, Barbara Turchi, Filippo Fratini, Sara Degl'Innocenti, et al. 2017. « Identification of Candidate Genes for Paratuberculosis Resistance in the Native Italian Garfagnina Goat Breed ». *Tropical Animal Health and Production* 49 (6): 1135-42. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1306-8>.
- Chiodini, R. J., et J. Hermon-Taylor. 1993. « The Thermal Resistance of Mycobacterium Paratuberculosis in Raw Milk under Conditions Simulating Pasteurization ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 5 (4): 629-31. <https://doi.org/10.1177/104063879300500424>.
- Chiodini, R. J., H. J. Van Kruiningen, et R. S. Merkal. 1984. « Ruminant Paratuberculosis (Johne's Disease): The Current Status and Future Prospects ». *The Cornell Veterinarian* 74 (3): 218-62.
- Chiodini, Rodrick J., William M. Chamberlin, Jerzy Sarosiek, et Richard W. McCallum. 2012. « Crohn's Disease and the Mycobacterioses: A Quarter Century Later. Causation or

- Simple Association? » *Critical Reviews in Microbiology* 38 (1): 52-93.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.638273>.
- Chui, Linda W., Robin King, Patricia Lu, Ken Manninen, et Jeong Sim. 2004. « Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by polymerase chain reaction ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48 (1): 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.08.007>.
- Collins, Michael T., Scott J. Wells, Kristine R. Petrini, James E. Collins, Ronald D. Schultz, et Robert H. Whitlock. 2005. « Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12 (6): 685-92. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.6.685-692.2005>.
- Cook, Kimberly L., Jenks S. Britt, et Carl H. Bolster. 2010. « Survival of *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis in Biofilms on Livestock Watering Trough Materials ». *Veterinary Microbiology* 141 (1-2): 103-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.013>.
- Cousins, Dv, R Whittington, I Marsh, A Masters, Rj Evans, et P Kluver. 1999. « Mycobacteria Distinct from *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis Isolated from the Faeces of Ruminants Possess IS 900 -like Sequences Detectable by IS 900 Polymerase Chain Reaction: Implications for Diagnosis ». *Molecular and Cellular Probes* 13 (6): 431-42. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0275>.
- Crossley, Beate M., Francisco J. Zagmutt-Vergara, Terry L. Fyock, Robert H. Whitlock, et Ian A. Gardner. 2005. « Fecal Shedding of *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis by Dairy Cows ». *Veterinary Microbiology* 107 (3-4): 257-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.017>.
- Delgado, L., J. F. García Marín, M. Muñoz, J. Benavides, R. A. Juste, C. García-Pariente, M. Fuertes, J. González, M. C. Ferreras, et V. Pérez. 2013. « Pathological Findings in Young and Adult Sheep Following Experimental Infection With 2 Different Doses of *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis ». *Veterinary Pathology* 50 (5): 857-66. <https://doi.org/10.1177/0300985813476066>.
- Dhand, Navneet K., Evan Sergeant, Jenny-Ann L. M. L. Toribio, et Richard J. Whittington. 2010. « Estimation of Sensitivity and Flock-Sensitivity of Pooled Faecal Culture for *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis in Sheep ». *Preventive Veterinary Medicine* 95 (3-4): 248-57. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.03.013>.

- Donaghy, J. A., J. Johnston, et M. T. Rowe. 2011. « Detection of Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis in Cheese, Milk Powder and Milk Using IS900 and F57-Based QPCR Assays ». *Journal of Applied Microbiology* 110 (2): 479-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04905.x>.
- efsa. 2014. « Proceedings of the 4th ParaTB Forum ». In , 127 pages. Parme, Italie. http://www.paratuberculosis.net/proceedings/ParatbForum/proc_pf_2014.pdf.
- Eisenberg, S., M. Nielen, J. Hoeboer, M. Bouman, D. Heederik, et A. Koets. 2011. « Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Bioaerosols after Depopulation and Cleaning of Two Cattle Barns ». *The Veterinary Record* 168 (22): 587. <https://doi.org/10.1136/vr.d1091>.
- Eisenberg, Susanne W. F., Ad P. Koets, Jeroen Hoeboer, Marina Bouman, Dick Heederik, et Mirjam Nielen. 2010. « Presence of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Environmental Samples Collected on Commercial Dutch Dairy Farms ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (18): 6310-12. <https://doi.org/10.1128/AEM.00998-10>.
- Eisenberg, Susanne W. F., Ad P. Koets, Mirjam Nielen, Dick Heederik, Rienske Mortier, Jeroen De Buck, et Karin Orsel. 2011. « Intestinal Infection Following Aerosol Challenge of Calves with Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis ». *Veterinary Research* 42 (décembre): 117. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-117>.
- Elguezabal, Natalia, Felix Bastida, Iker A. Sevilla, Nuria González, Elena Molina, Joseba M. Garrido, et Ramón A. Juste. 2011. « Estimation of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Growth Parameters: Strain Characterization and Comparison of Methods ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (24): 8615-24. <https://doi.org/10.1128/AEM.05818-11>.
- Ellingson, J. L., C. A. Bolin, et J. R. Stabel. 1998. « Identification of a Gene Unique to Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis and Application to Diagnosis of Paratuberculosis ». *Molecular and Cellular Probes* 12 (3): 133-42. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0167>.
- Eppleston, J, et Rj Whittington. 2001. « Isolation of Mycobacterium Avium Subsp Paratuberculosis from the Semen of Rams with Clinical Johnne's Disease ». *Australian Veterinary Journal* 79 (11): 776-77. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10898.x>.

- Falkinham, Joseph O. 2003. « Mycobacterial Aerosols and Respiratory Disease ». *Emerging Infectious Diseases* 9 (7): 763-67. <https://doi.org/10.3201/eid0907.02-0415>.
- Fock-Chow-Tho, D., E. Topp, E. A. Ibeagha-Awemu, et N. Bissonnette. 2017. « Comparison of Commercial DNA Extraction Kits and Quantitative PCR Systems for Better Sensitivity in Detecting the Causative Agent of Paratuberculosis in Dairy Cow Fecal Samples ». *Journal of Dairy Science* 100 (1): 572-81. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11384>.
- Ganusov, Vitaly V., Don Klinkenberg, Douwe Bakker, et Ad P. Koets. 2015. « Evaluating Contribution of the Cellular and Humoral Immune Responses to the Control of Shedding of Mycobacterium Avium Spp. Paratuberculosis in Cattle ». *Veterinary Research* 46 (juin): 62. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0204-1>.
- Gao, Y., J. Cao, S. Zhang, Q. Zhang, et D. Sun. 2018. « Short Communication: Heritability Estimates for Susceptibility to Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis Infection in Chinese Holstein Cattle ». *Journal of Dairy Science* 101 (8): 7274-79. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13264>.
- Gerrard, Zara E., Benjamin M. C. Swift, George Botsaris, Ross S. Davidson, Michael R. Hutchings, Jonathon N. Huxley, et Catherine E. D. Rees. 2018. « Survival of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Retail Pasteurised Milk ». *Food Microbiology* 74 (septembre): 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.004>.
- Gillan, Sonia, Rory O'Brien, Alan D. Hughes, et J. Frank T. Griffin. 2010. « Identification of Immune Parameters to Differentiate Disease States among Sheep Infected with Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 17 (1): 108-17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00359-09>.
- Grant, Irene R., Antonio C. G. Foddai, James C. Tarrant, Brenna Kunkel, Faye A. Hartmann, Sheila McGuirk, Chungyi Hansen, Adel M. Talaat, et Michael T. Collins. 2017. « Viable Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis Isolated from Calf Milk Replacer ». *Journal of Dairy Science* 100 (12): 9723-35. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13154>.
- Grewal, Sukhbir K., Sreekumari Rajeev, Srinand Sreevatsan, et Frederick C. Michel. 2006. « 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* 72 (1): 565-74. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.565-574.2006>.

- Gumber, Sanjeev, et Richard J. Whittington. 2009. « Analysis of the Growth Pattern, Survival and Proteome of *Mycobacterium avium* Subsp. Paratuberculosis Following Exposure to Heat ». *Veterinary Microbiology* 136 (1-2): 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.003>.
- Hermon-Taylor, John. 2009. « *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis, Crohn's Disease and the Doomsday Scenario ». *Gut Pathogens* 1 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-15>.
- Hulzen, K. J. E. van, A. P. Koets, M. Nielen, H. C. M. Heuven, J. a. M. van Arendonk, et D. Klinkenberg. 2014. « The Effect of Genetic Selection for Johne's Disease Resistance in Dairy Cattle: Results of a Genetic-Epidemiological Model ». *Journal of Dairy Science* 97 (3): 1762-73. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7032>.
- Kalis, C. H. J., M. T. Collins, J. W. Hesselink, et H. W. Barkema. 2003. « Specificity of Two Tests for the Early Diagnosis of Bovine Paratuberculosis Based on Cell-Mediated Immunity: The Johnin Skin Test and the Gamma Interferon Assay ». *Veterinary Microbiology* 97 (1-2): 73-86.
- Kawaji, Satoko, Douglas J. Begg, Karren M. Plain, et Richard J. Whittington. 2011. « A Longitudinal Study to Evaluate the Diagnostic Potential of a Direct Faecal Quantitative PCR Test for Johne's Disease in Sheep ». *Veterinary Microbiology* 148 (1): 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.022>.
- Khare, Sangeeta, L. Garry Adams, Jason Osterstock, Allen Roussel, et Laetitia David. 2008. « Effects of Shipping and Storage Conditions of Fecal Samples on Viability of *Mycobacterium Paratuberculosis* ». *Journal of Clinical Microbiology* 46 (4): 1561-62. <https://doi.org/10.1128/JCM.02348-07>.
- Khol, Johannes L., Petr Kralik, Iva Slana, Vladimir Beran, Christine Aurich, Walter Baumgartner, et Ivo Pavlik. 2010. « Consecutive Excretion of *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations ». *The Journal of Veterinary Medical Science* 72 (10): 1283-88.
- Klijn, N., A. A. Herrewegh, et P. de Jong. 2001. « Heat Inactivation Data for *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis: Implications for Interpretation ». *Journal of Applied Microbiology* 91 (4): 697-704.
- Kralik, Petr, Vladimir Babak, et Radka Dziedzinska. 2018. « The Impact of the Antimicrobial Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria on the Growth Performance of

- Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis ». *Frontiers in Microbiology* 9: 638. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00638>.
- Kruijf, Marcel de, Rodney Govender, Dermot Yearsley, Aidan Coffey, et Jim O'Mahony. 2017. « A comparative study evaluating the efficacy of IS_MAP04 with IS900 and IS_MAP02 as a new diagnostic target for the detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from bovine faeces ». *Veterinary Microbiology* 204 (mai): 104-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.020>.
- Kuehnel, M. P., R. Goethe, A. Habermann, E. Mueller, M. Rohde, G. Griffiths, et P. Valentin-Weigand. 2001. « Characterization of the Intracellular Survival of Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis: Phagosomal PH and Fusogenicity in J774 Macrophages Compared with Other Mycobacteria ». *Cellular Microbiology* 3 (8): 551-66.
- Lam, Jonathan, Marc Herant, Micah Dembo, et Volkmar Heinrich. 2009. « Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages ». *Biophysical Journal* 96 (1): 248-54. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.139154>.
- Lambeth, C., L. A. Reddacliff, P. Windsor, K. A. Abbott, H. McGregor, et R. J. Whittington. 2004. « Intrauterine and Transmammary Transmission of Mycobacterium Avium Subsp Paratuberculosis in Sheep ». *Australian Veterinary Journal* 82 (8): 504-8.
- Leão, Céilia, Ana Botelho, Elisabete Martins, Carla Aguiar, Inês Rebelo, Telmo Nunes, et Ricardo Bexiga. 2017. « Presence of Mycobacterium Avium Subs. Paratuberculosis DNA in Milk Used to Feed Calves in Portugal ». *The Journal of Dairy Research* 84 (2): 124-27. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000164>.
- Leite, Fernando L., Kevin D. Stokes, Suelee Robbe-Austerman, et Judith R. Stabel. 2013. « Comparison of Fecal DNA Extraction Kits for the Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis by Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 25 (1): 27-34. <https://doi.org/10.1177/1040638712466395>.
- Li, Lingling, John P. Bannantine, Qing Zhang, Alongkorn Amonsin, Barbara J. May, David Alt, Nilanjana Banerji, Sagarika Kanjilal, et Vivek Kapur. 2005. « The Complete Genome Sequence of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (35): 12344-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505662102>.

- Magombedze, Gesham, Tinevimbo Shiri, Shigetoshi Eda, et Judy R. Stabel. 2017. « Inferring Biomarkers for Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection and Disease Progression in Cattle Using Experimental Data ». *Scientific Reports* 7: 44765. <https://doi.org/10.1038/srep44765>.
- Mallikarjunappa, Sanjay, M. Sargolzaei, L. F. Brito, K. G. Meade, N. A. Karrow, et S. D. Pant. 2018. « Short Communication: Uncovering Quantitative Trait Loci Associated with Resistance to Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis Infection in Holstein Cattle Using a High-Density Single Nucleotide Polymorphism Panel ». *Journal of Dairy Science* 101 (8): 7280-86. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14388>.
- Mathevon, Y., M-P Lafort, C. Tasca, E Galan, G. Foucras, et F. Corbière. 2015. « La vaccination contre la paratuberculose ovine : développements méthodologiques et évaluation de son efficacité, Rencontres autour des recherches sur les ruminants ». 03/12 2015.
- Mathevon, Yoann. 2018. *Utilisation des analyses en mélanges pour l'évaluation et le suivi du statut sanitaire des troupeaux : application à la paratuberculose des ovins*. Thèse Université Toulouse 3 Paul Sabatier.
- Mathevon, Yoann, Gilles Foucras, Rémy Falguières, et Fabien Corbiere. 2017. « Estimation of the Sensitivity and Specificity of Two Serum ELISAs and One Fecal QPCR for Diagnosis of Paratuberculosis in Sub-Clinically Infected Young-Adult French Sheep Using Latent Class Bayesian Modeling ». *BMC Veterinary Research* 13 (1): 230. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1145-x>.
- McKenna, S. L. B., D. C. Sockett, G. P. Keefe, J. McClure, J. A. VanLeeuwen, et H. W. Barkema. 2005. « Comparison of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 17 (5): 463-66. <https://doi.org/10.1177/104063870501700510>.
- Mercier, P., C. Baudry, F. Beaudeau, H. Seegers, et X. Malher. 2010. « Estimated Prevalence of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infection in Herds of Dairy Goats in France ». *The Veterinary Record* 167 (11): 412-15. <https://doi.org/10.1136/vr.c4454>.
- Mitchell, R. M., G. F. Medley, M. T. Collins, et Y. H. Schukken. 2012. « A Meta-Analysis of the Effect of Dose and Age at Exposure on Shedding of Mycobacterium Avium

- Subspecies Paratuberculosis (MAP) in Experimentally Infected Calves and Cows ». *Epidemiology and Infection* 140 (2): 231-46. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000689>.
- Möbius, Petra, Helmut Hotzel, Astrid Rassbach, et Heike Köhler. 2008. « Comparison of 13 Single-Round and Nested PCR Assays Targeting IS900, ISMav2, F57 and Locus 255 for Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis ». *Veterinary Microbiology* 126 (4): 324-33. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.016>.
- Moravkova, M., V. Babak, A. Kralova, I. Pavlik, et I. Slana. 2012. « Culture- and Quantitative IS900 Real-Time PCR-Based Analysis of the Persistence of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in a Controlled Dairy Cow Farm Environment ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (18): 6608-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.01264-12>.
- Mortier, Rienske A.R., Herman W. Barkema, et Jeroen De Buck. 2015. « Susceptibility to and Diagnosis of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infection in Dairy Calves: A Review ». *Preventive Veterinary Medicine* 121 (3-4): 189-98. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.011>.
- Nielsen, S. S., et N. Toft. 2008. « Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques ». *Veterinary Microbiology* 129 (3): 217-35. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>.
- Norton, S., C. Heuer, et R. Jackson. 2009. « A Questionnaire-Based Cross-Sectional Study of Clinical Johne's Disease on Dairy Farms in New Zealand ». *New Zealand Veterinary Journal* 57 (1): 34-43. <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36866>.
- Pérez, V., J. F. García Marín, et J. J. Badiola. 1996. « Description and Classification of Different Types of Lesion Associated with Natural Paratuberculosis Infection in Sheep ». *Journal of Comparative Pathology* 114 (2): 107-22.
- R Core Team. R. s. d. *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. [<https://www.R-project.org/>].
- Rathnaiah, Govardhan, Denise K. Zinniel, John P. Bannantine, Judith R. Stabel, Yrjö T. Gröhn, Michael T. Collins, et Raúl G. Barletta. 2017. « Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, the Etiologic Agent of Johne's Disease ». *Frontiers in Veterinary Science* 4 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>.

- Ricchi, Matteo, Roberto Savi, Luca Bolzoni, Stefano Pongolini, Irene R. Grant, Caterina De Cicco, Giulia Cerutti, Giuliana Cammi, Chiara A. Garbarino, et Norma Arrigoni. 2016. « Estimation of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Load in Raw Bulk Tank Milk in Emilia-Romagna Region (Italy) by QPCR ». *MicrobiologyOpen* 5 (4): 551-59. <https://doi.org/10.1002/mbo3.350>.
- Ruiz-Larrañaga, O., J. M. Garrido, M. Iriondo, C. Manzano, E. Molina, A. P. Koets, V. P. M. G. Rutten, R. A. Juste, et A. Estonba. Dec 2010a. « Genetic Association between Bovine NOD2 Polymorphisms and Infection by Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Holstein-Friesian Cattle ». *Animal Genetics* 41 (6): 652-55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02055.x>.
- Ruiz-Larrañaga, O., J. M. Garrido, M. Iriondo, C. Manzano, E. Molina, I. Montes, P. Vazquez, et al. Dec 2010c. « SP110 as a Novel Susceptibility Gene for Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infection in Cattle ». *Journal of Dairy Science* 93 (12): 5950-58. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3340>.
- Ruiz-Larrañaga, O., M. Iriondo, C. Manzano, M. Agirre, J. M. Garrido, J. A. Juste, et A. Estonba. 2012. « Single-Nucleotide Polymorphisms in the Bovine CD209 Candidate Gene for Susceptibility to Infection by Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis ». *Animal Genetics* 43 (5): 646-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02316.x>.
- Ruiz-Larrañaga, Otsanda, Patricia Vázquez, Mikel Iriondo, Carmen Manzano, Mikel Aguirre, Joseba M. Garrido, Ramon A. Juste, et Andone Estonba. 2017. « Evidence for gene-gene epistatic interactions between susceptibility genes for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle ». *Livestock Science* 195 (janvier): 63-66. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.11.012>.
- Schaik, Gerdien van, Mónica Pradenas F, Armín Mella N, et Juan Kruze V. 2007. « 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* 82 (1-2): 159-65. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.05.018>.
- Sergeant, E. S. G., R. J. Whittington, et S. J. More. 2002. « Sensitivity and Specificity of Pooled Faecal Culture and Serology as Flock-Screening Tests for Detection of Ovine Paratuberculosis in Australia ». *Preventive Veterinary Medicine* 52 (3-4): 199-211.

- Shaughnessy, L. J., L. A. Smith, J. Evans, D. Anderson, G. Caldow, G. Marion, J. C. Low, et M. R. Hutchings. 2013. « High Prevalence of Paratuberculosis in Rabbits Is Associated with Difficulties in Controlling the Disease in Cattle ». *Veterinary Journal (London, England: 1997)* 198 (1): 267-70. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.030>.
- Smith, S. L., P. R. Wilson, M. G. Collett, C. Heuer, D. M. West, M. Stevenson, et J. P. Chambers. 2014. « Liver Biopsy Histopathology for Diagnosis of Johne's Disease in Sheep ». *Veterinary Pathology* 51 (5): 915-18. <https://doi.org/10.1177/0300985813516644>.
- Spiess, Andrej-Nikolai. 2018. *qpcR: Modelling and Analysis of Real-Time PCR Data* (version 1.4-1). <https://CRAN.R-project.org/package=qpcR>.
- Stewart, D. J., J. A. Vaughan, P. L. Stiles, P. J. Noske, M. L. V. Tizard, S. J. Prowse, W. P. Michalski, K. L. Butler, et S. L. Jones. 2004. « A Long-Term Study in Merino Sheep Experimentally Infected with Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis: Clinical Disease, Faecal Culture and Immunological Studies ». *Veterinary Microbiology* 104 (3-4): 165-78. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.007>.
- St-Jean, Guy, et Antoinette D. Jernigan. 1991. « Treatment of Mycobacterium Paratuberculosis Infection in Ruminants ». *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 7 (3): 793-804. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31085-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31085-9).
- Sung, N., et M. T. Collins. 1998. « Thermal Tolerance of Mycobacterium Paratuberculosis ». *Applied and Environmental Microbiology* 64 (3): 999-1005.
- Tasara, T., L. E. Hoelzle, et R. Stephan. 2005. « Development and Evaluation of a Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis (MAP) Specific Multiplex PCR Assay ». *International Journal of Food Microbiology* 104 (3): 279-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.009>.
- Tavornpanich, Saraya, Ian A. Gardner, Randall J. Anderson, Sang Shin, Robert H. Whitlock, Terry Fyock, John M. Adaska, Richard L. Walker, et Sharon K. Hietala. 2004. « Evaluation of Microbial Culture of Pooled Fecal Samples for Detection of Mycobacterium Avium Subsp Paratuberculosis in Large Dairy Herds ». *American Journal of Veterinary Research* 65 (8): 1061-70.
- Thompson, B. R., R. G. Clark, et C. G. Mackintosh. 2007. « Intra-Uterine Transmission of Mycobacterium Avium Subsp Paratuberculosis in Subclinically Affected Red Deer (Cervus Elaphus) ». *New Zealand Veterinary Journal* 55 (6): 308-13. <https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36786>.

- Wells, S. J., et B. A. Wagner. 2000. « Herd-Level Risk Factors for Infection with Mycobacterium Paratuberculosis in US Dairies and Association between Familiarity of the Herd Manager with the Disease or Prior Diagnosis of the Disease in That Herd and Use of Preventive Measures ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216 (9): 1450-57.
- Wells, Scott J., Michael T. Collins, Kay S. Faaberg, Carrie Wees, Saraya Tavoranpanich, Kristine R. Petrini, James E. Collins, Natalia Cernicchiaro, et Robert H. Whitlock. 2006. « Evaluation of a Rapid Fecal PCR Test for Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Dairy Cattle ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 13 (10): 1125-30. <https://doi.org/10.1128/CVI.00236-06>.
- Wells, Scott J., Robert H. Whitlock, Cynthia J. Lindeman, et Terry Fyock. 2002. « Evaluation of Bacteriologic Culture of Pooled Fecal Samples for Detection of Mycobacterium Paratuberculosis ». *American Journal of Veterinary Research* 63 (8): 1207-11.
- Whittington, R. J., S. Fell, D. Walker, S. McAllister, I. Marsh, E. Sergeant, C. A. Taragel, D. J. Marshall, et I. J. Links. 2000. « Use of Pooled Fecal Culture for Sensitive and Economic Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection in Flocks of Sheep ». *Journal of Clinical Microbiology* 38 (7): 2550-56.
- Whittington, Richard J., Ian B. Marsh, et Leslie A. Reddacliff. 2005. « Survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Dam Water and Sediment ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5304-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5304-5308.2005>.
- Whittington, Richard J., D. Jeff Marshall, Paul J. Nicholls, Ian B. Marsh, et Leslie A. Reddacliff. 2004. « Survival and Dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the Environment ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5): 2989-3004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004>.
- Whittington, Richard J., et Peter A. Windsor. 2009. « In Utero Infection of Cattle with Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis: A Critical Review and Meta-Analysis ». *Veterinary Journal (London, England: 1997)* 179 (1): 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>.
- Williams, E. S., S. P. Snyder, et K. L. Martin. 1983. « Pathology of Spontaneous and Experimental Infection of North American Wild Ruminants with Mycobacterium Paratuberculosis ». *Veterinary Pathology* 20 (3): 274-90. <https://doi.org/10.1177/030098588302000304>.

- Wilson, D. J., K. Rood, P. Biswas, et T. M. Byrem. 2010. « Herd-Level Prevalence of Johne's Disease in Utah and Adjacent Areas of the Intermountain West as Detected by a Bulk-Tank Milk Surveillance Project ». *Journal of Dairy Science* 93 (12): 5792-97. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3481>.
- Windsor, P. A. 2015. « Paratuberculosis in Sheep and Goats ». *Veterinary Microbiology* 181 (1-2): 161-69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>.
- Zanetti, Stefania, Paola Molicotti, Sara Cannas, Silvia Ortu, Niyaz Ahmed, et Leonardo A. Sechi. 2006. « “In Vitro” Activities of Antimycobacterial Agents against Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Linked to Crohn's Disease and Paratuberculosis ». *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5 (novembre): 27. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-27>.
- Zare, Yalda, George E. Shook, Michael T. Collins, et Brian W. Kirkpatrick. 2014. « Genome-Wide Association Analysis and Genomic Prediction of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infection in US Jersey Cattle ». *PloS One* 9 (2): e88380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088380>.

Annexe 1: Protocole d'extraction / purification

Extraction :

Des mélanges préalables sont réalisés :

- Mélange des billes magnétiques : 60 ml de MB2 et 1,3 ml de billes magnétiques sont mélangés.
- Mélange de la protéinase K : La protéinase K est dissoute dans 2,6 ml de Protein Buffer. 1ml de cette dissolution est ensuite mélangé à 500µL d'EPC-E (kit ADIAVET™ PARATB REAL TIME) et 10 ml de tampon T1. De ce mélange, 110 µL sont distribués dans chaque puit échantillon de la plaque issue du broyage des échantillons filtrés.

Les différentes plaques sont constituées comme suit :

- Plaque 1 (Tampon de capture, plaque Deep Well KF96) : 600 µL du mélange des billes magnétiques sont distribués dans chaque puit échantillon et 200 µL de la plaque échantillon
- Plaque 2 (Tampon de lavage 1, plaque Deep Well KF96) : 350 µL de produit MB3 sont distribués dans chaque puit échantillon
- Plaque 3 (Tampon de lavage 2, plaque Deep Well KF96) : 350 µL de produit MB4 sont distribués dans chaque puit échantillon
- Plaque 4 (Tampon de lavage 3, plaque Deep Well KF96) : 350 µL d'éthanol à 80° sont distribués dans chaque puit échantillon
- Plaque 5 (Elution, plaque Elution KF96) : 60 µL de tampon MB6 sont distribués dans chaque puit échantillon

Amplification :

L'amplification est préparée à l'aide du kit d'amplification ADI045-100, selon les étapes suivantes : distribution dans tous les puits de 20 µL de solution d'amplification A5 ; distribution de 5 µL d'eau microfiltrée dans chaque puit attribué à un contrôle négatif ; Distribution de 5 µL de Para Positive Control dans chaque puit attribué à un contrôle positif ; Distribution de 5 µL d'échantillon extrait et de gamme, par puit échantillon et puit de gamme respectivement.

TOULOUSE 2019

NOMS : PREVOT
TROPEE

PRENOMS : Camille
Alliaume

TITRE : PCR quantitative appliquée à des mélanges de fèces pour le diagnostic de la paratuberculose caprine : comparaison de deux méthodes de préparation des échantillons

RESUME : le développement d'approches diagnostiques peu coûteuses, adaptées aux grands effectifs des troupeaux ovins ou caprins permettrait d'améliorer le dépistage de la paratuberculose chez les petits ruminants. L'objectif de cette étude était de comparer deux méthodes de préparation des échantillons de fèces afin d'optimiser la sensibilité de la qPCR appliquée à des mélanges d'échantillons. Des mélanges ont été réalisés à partir d'échantillons de fèces ovins et caprins caractérisés individuellement comme issus d'animaux faiblement excréteurs de *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, selon plusieurs facteurs de variations : techniques de mélanges (fèces en phase solide ou liquide), taille des mélanges (5 ou 10 échantillons) et nombre d'échantillons positifs dans le mélange (1, 2 ou 4). L'homogénéité des résultats de qPCR n'est pas apparue améliorée par la réalisation de mélanges en phase liquide. Les estimateurs de sensibilité de la qPCR appliquée à des mélanges de fèces en phase liquide apparaissent cependant satisfaisants, variant de 69,5% (mélange 1/5) à 100% (mélange 4/10). Dans ces conditions, l'application de la qPCR à des mélanges de fèces apparaît prometteuse dans le cadre de programmes de dépistage de la paratuberculose à l'échelle collective.

MOTS CLES : Paratuberculose ; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ; PCR quantitative ; caprins, ovins ; mélange de fèces ; sensibilité

TITLE: Quantitative PCR applied to pooled fecal samples for diagnosis of paratuberculosis in goat : comparison of two sample preparation methods.

ABSTRACT: the development of inexpensive diagnostic approaches at the collective scale in sheep and goat is needed to improve paratuberculosis screening in small ruminants. The objective of this study was to compare two methods of fecal sample preparation methods to optimize the sensitivity of qPCR applied to sample pools. Pools were built from sheep or goat feces individually characterized as coming from low *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* shedding animals and according to several variation factors: pooling method (solid or liquid phase feces), pool size (5 or 10 samples) and number of positive samples in the pool (1, 2 or 4). The homogeneity of the qPCR results was not different between the two preparation method. The sensitivity estimators of qPCR applied to pool built from liquid phase feces, appear satisfactory, ranging from 69.5% (1/5 pools) to 100% (4/10 pools). Under these conditions, the use of qPCR to analyze fecal pools appears promising in the context of mass screening programs for paratuberculosis.

KEY WORDS: Paratuberculosis; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; real-time PCR; goat, sheep; pooled fecal samples; sensitivity