





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/> 25812

**To cite this version:**

Duret, Jérémy  and Baldet, Kevin . *Vaccination contre la paratuberculose bovine : situation épidémiologique dans 8 élevages bovins laitiers de la Meuse*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 77 p.

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

ANNEE 2019 THESE : 2019 – TOU 3 – 4098

---

# VACCINATION CONTRE LA PARATUBERCULOSE BOVINE : SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE DANS 8 ELEVAGES BOVINS LAITIERS DE LA MEUSE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**Jeremy DURET**

Né, le 08 septembre 1994 à L'Isle-d'Espagnac (16)

et

**Kévin BALDET**

Né, le 15 octobre 1993 à Rodez (12)

---

**Directeur de thèse : Mr Fabien CORBIERE**

---

**JURY**

PRESIDENT :

**Mr Eric OSWALD**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mr Fabien CORBIERE**

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Mr Gilles FOUCRAS**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



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

**Directeur** : Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- 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. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- 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*
- 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*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- 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*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

**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*  
 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. **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*  
 Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
 Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
 Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
 M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*  
 Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
 Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*  
 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*

#### **ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS**

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
 M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*  
 Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*  
 Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*  
 M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

#### **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*  
 M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*  
 M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
 M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

## 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 CORBIERE,  
*Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*  
*Pathologie des Ruminants,*  
Pour nous avoir proposé ce sujet de thèse et pour son aide précieuse.  
Pour tout le temps consacré à ce travail,  
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS,  
*Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*  
*Pathologie des Ruminants,*  
Pour avoir accepté de prendre part à ce jury et pour son implication dans ce travail,  
Sincères remerciements.

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	5
SOMMAIRE .....	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	8
LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
INTRODUCTION.....	11
I) CONTEXTE, NATURE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS .....	22
II) MATERIEL ET METHODES .....	23
II.1) Population d'étude.....	23
II.1.1) Elevages .....	23
II.1.2) Programme de maîtrise et de vaccination vis-à-vis de la paratuberculose.....	24
II.1.3) Effectifs et prélèvements .....	25
II.1.3.1) Modalités de prélèvements.....	25
II.1.3.2) Effectifs prélevés au total .....	26
II.1.3.3) Effectifs prélevés selon le statut vaccinal.....	26
II.2) Analyses biologiques.....	28
II.2.1) Evaluation du statut sérologique par ELISA.....	28
II.2.2) Evaluation de l'excrétion de <i>Map</i> dans les fèces par qPCR.....	30
II.2.2.1) Kit qPCR et principe .....	30
II.2.2.2) Quantification de l'excrétion de <i>Map</i> .....	34
II.3) Analyse des données .....	36
III) RESULTATS .....	37
III.1) Age des bovins prélevés et âge à la vaccination .....	37
III.2) Résultats d'examens de laboratoire disponibles .....	38
III.3) Résultats des analyses biologiques .....	39
III.3.1) Sérologie ELISA paratuberculose : 1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> sérologies .....	39
III.3.2) Sérologie ELISA paratuberculose par statut vaccinal .....	41
III.3.3) Sérologie ELISA paratuberculose par élevage et par statut vaccinal .....	42
III.4) qPCR paratuberculose sur fèces : ensemble des échantillons.....	44
III.4.1) qPCR paratuberculose sur fèces : analyse à l'échelle des bovins .....	46
III.4.2) Niveaux d'excrétion par élevage .....	47
III.4.3) qPCR paratuberculose sur fèces selon le statut vaccinal .....	48
III.4.4) qPCR paratuberculose sur fèces selon l'élevage et le statut vaccinal.....	49
III.4.5) Niveau d'excrétion selon le statut vaccinal.....	53
III.5) Effet de l'âge à la vaccination.....	55
III.5.1) Effet de l'âge à la vaccination sur le statut sérologique à la première analyse....	55
III.5.2) Effet de l'âge à la vaccination sur le statut excréteur .....	56

III.5.3) Effet de l'âge à la vaccination sur le niveau d'excrétion. ....	57
IV) DISCUSSION.....	59
IV.1) Population et schéma d'étude.....	59
IV.2) Résultats.....	62
IV.2.1) Réponses sérologiques.....	62
IV.2.2) Statut excréteur fécal .....	65
CONCLUSION .....	68
BIBLIOGRAPHIE .....	71



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### **Figures :**

Figure 1 : Evolution de l'excrétion fécale et de la sérologie au cours d'une infection par <i>Map</i> (D'après l'AFSSA, 2009).....	14
Figure 2 : étapes du test ELISA .....	29
Figure 3 : Représentation des 3 étapes de la méthode Taqman (INRA Montpellier) .....	32
Figure 4 : Principes du Ct avec pour exemple un seuil de 0,05 .....	33
Figure 5 : courbes de fluorescence de la gamme de dilution (Light Cycler 96) .....	34
Figure 6 : Régression linéaire de $Ct=f(\text{Log}(\text{IS900}))$ réalisée à partir de la gamme de dilution d'ADN purifié de la souche K10 .....	35
Figure 7 : âge en mois des bovins vaccinés et non vaccinés au moment des 3 séries de prélèvements.....	37
Figure 8 : distribution des âges (en mois) des 237 bovins vaccinés.....	38
Figure 9 : Distribution des valeurs de Ct.....	45
Figure 10 : distribution des valeurs de Ct des qPCR sur fèces selon le statut vaccinal et le statut sérologique des bovins (n=224 échantillons positifs en qPCR) .....	54
Figure 11 : distribution des échantillons positifs en fonction de l'âge à la vaccination et du niveau d'excrétion.....	57

### **Tableaux :**

Tableau 1 : incidence sérologique annuelle vis-à-vis de la paratuberculose sur les campagnes 2014 à 2017 dans les 8 élevages inclus dans l'étude, calculées d'après les résultats de prophylaxie.....	23
Tableau 2 : nombre de prélèvements par animaux prélevés et par élevage .....	26
Tableau 3 : nombre de prélèvements en fonction du statut vaccinal des animaux .....	27
Tableau 4 : répartition des effectifs au sein des élevages selon le nombre de prélèvements et le statut vaccinal.....	27
Tableau 5 : interprétation du test ELISA en fonction de la valeur S/P .....	30
Tableau 6 : critères de validation des résultats qPCR .....	31
Tableau 7 : moyenne des Ct et coefficients de variation obtenus pour les principaux points de la gamme de dilution d'ADN purifié de la souche K10 .....	35
Tableau 8 : statistiques descriptives du nombre de prélèvements en fonction des âges .....	37
Tableau 9 : effectifs et nombre d'analyses .....	38
Tableau 10 : résultats des premières et deuxièmes sérologies .....	39
Tableau 11 : résultats des sérologies pour les 32 bovins testés 3 fois.....	40
Tableau 12 : résultats des 2 premières sérologies chez les bovins vaccinés .....	41
Tableau 13 : résultats des 2 premières sérologies chez les bovins non vaccinés .....	42
Tableau 14 : prévalence sérologique par troupeau et par statut vaccinal.....	43
Tableau 15 : probabilités critiques (p-values) des comparaisons 2 à 2 entre élevages pour le pourcentage de bovins ayant eu au moins un résultat positif ou douteux en sérologie.....	44
Tableau 16 : grille d'interprétation du résultat en fonction de la valeur du Ct.....	45
Tableau 17 : résultats des 2 premières séries de qPCR .....	46
Tableau 18 : résultats pour les bovins ayant eu 3 qPCR sur fèces .....	47
Tableau 19 : distribution des bovins selon le niveau d'excrétion et l'élevage .....	47
Tableau 20 : résultats des 2 qPCR sur bovins non vaccinés .....	48
Tableau 21 : résultats des 2 qPCR sur bovins vaccinés .....	49

Tableau 22 : résultats pour les bovins ayant eu 3 qPCR sur fèces en fonction du statut vaccinal .....	49
Tableau 23 : effectifs d'animaux positifs par élevage en fonction du statut vaccinal .....	50
Tableau 24 : probabilités critiques (p-values) des comparaisons 2 à 2 entre élevages pour le pourcentage de bovins non vaccinés ayant eu au moins un résultat positif en qPCR sur fèces. ....	50
Tableau 25 : probabilités critiques (p-values) des comparaisons 2 à 2 entre élevages pour le pourcentage de bovins vaccinés ayant eu au moins un résultat positif en qPCR sur fèces.....	51
Tableau 26 : comparaison des résultats de qPCR en fonction des différents groupes étudiés.	52
Tableau 27 : effectifs de bovins excréteurs par niveau d'excrétion et par statut vaccinal.....	53
Tableau 28 : répartition des résultats de qPCR en équivalent bactéries par gramme de fèces	54
Tableau 29 : répartition des résultats de la première sérologie en fonction de l'âge à la vaccination .....	55
Tableau 30 : répartition des résultats de la première qPCR en fonction de l'âge à la vaccination .....	56
Tableau 31 : répartition des résultats de toutes les qPCR en fonction de l'âge à la vaccination .....	57

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
Ct : Cycle seuil  
DDCSPP : Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations  
DIVA : Differentiating Infected from Vaccinated Animals  
DO<sub>CN</sub> : Densité Optique des Contrôles Négatifs  
DO<sub>CP</sub> : Densité Optique des Contrôles Positifs  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
GDS : Groupement de Défense Sanitaire  
IC : Intervalle de Confiance  
IDC : Intradermotuberculation Comparative  
IDS : Intradermotuberculation Simple  
IHAP : Interaction Hôtes Agents Pathogènes  
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique  
*Map* : *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
OIE : Office International des Epizooties  
OR : Odds Ratio  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction  
PH : Prim'Holstein  
RR : Risque Relatif  
S/P : Sample/Positive ou rapport de la densité optique de l'échantillon sur la densité optique du contrôle positif  
UFC : Unité Formant Colonie  
UMR : Université Mixte de Recherche

## INTRODUCTION

La paratuberculose ou "maladie de Johne" est une maladie enzootique contagieuse rencontrée chez les ruminants et due à *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (Map)* qui provoque chez son hôte une entérite chronique conduisant à terme à un dépérissement de l'animal. Cette maladie a une répartition mondiale mais est davantage présente dans les grandes zones d'élevage de ruminants, notamment aux Etats-Unis, au Canada ou encore en Europe. Les données indiquent que la paratuberculose bovine se retrouve plus souvent dans les systèmes de production laitiers que dans les systèmes allaitants (Gupta et al., 2018). En Europe 20% des élevages bovins seraient concernés, avec une prévalence d'infection intra-troupeau pouvant dépasser 50% (Nielsen, Toft, 2009). La paratuberculose a un impact économique important. Ceci est lié d'une part aux pertes directes engendrées par la maladie, conduisant à un amaigrissement progressif dont l'issue est fatale et, d'autre part à une baisse de production, en moyenne de 6% du volume de lait produit sur une lactation (McAloon et al., 2016). De plus, la paratuberculose rend son hôte plus sensible à d'autres maladies comme les mammites (Rossi et al., 2017). Des effets délétères sur la fertilité et la fécondité sont observés par ailleurs chez les vaches atteintes en phases clinique et subclinique (Johnson-Ifearulundu et al., 2000 ; Marcé et al., 2009). D'autre part, l'impact économique de la maladie peut s'expliquer par les frais de renouvellement prématurés des animaux et les frais de dépistage de l'infection afin d'éliminer les animaux atteints. Par manque de données épidémiologiques, il est difficile d'évaluer l'ampleur des pertes économiques au sein des élevages bovins français liées à la paratuberculose. La littérature fournit quelques chiffres qui varient selon les modèles de calcul utilisés, les pays et les systèmes d'élevage. Ces données ne sont donc pas extrapolables au cheptel de bovins laitiers français. A titre d'exemple, en terme d'impact sur le profit net annuel, un modèle sur des fermes écossaises a été étudié (Shrestha et al., 2018). Pour une prévalence standard de la maladie, c'est à dire en utilisant les valeurs de prévalence considérées comme les plus proches de la réalité au Royaume-Uni d'après l'étude de Cetinkaya *et al.* en 1998, la perte serait de 32% du profit annuel net en tenant compte de l'impact clinique (2% des animaux) et subclinique (15.5% des animaux) de la maladie, du taux de renouvellement (27.09%), de la chute de la production laitière (2.02%) et des coûts additionnels engendrés par la maladie, *i.e.* frais vétérinaires, dépistage *etc.* de 82.08 £ par vache et par an (Cetinkaya et al., 1998). Ces données correspondent à une perte économique par animal et par an estimée à 185 £ soit 206.86 €, valeur en accord avec une autre étude

menée aux Etats-Unis (Ott et al., 1999). Ainsi, la perte annuelle moyenne estimée pour un élevage touché par la paratuberculose est de 31940 £ (soit environ 37200 €), valeur proche de celle estimée par Groenendaal *et al.* en 2003 au Pays-Bas (34679£) (Groenendaal et al., 2003).

L'agent causal de la paratuberculose, ou bacille de Johne, appartient à la famille des *Mycobacteriaceae* et plus précisément au genre *Mycobacterium* qui compte actuellement 188 espèces (Gupta et al., 2018) divisé en deux groupes: celui des mycobactéries à croissance rapide et celui des mycobactéries à croissance lente dont fait partie *Mycobacterium avium*. La sous-espèce *paratuberculosis* se subdivise en deux souches notées C pour "Cattle" et S pour "Sheep". Ces deux types de souches sont différents d'un point de vue génotypique et phénotypique. Les souches C affectent toutes les espèces hôtes alors que les souches S se trouvent majoritairement chez les ovins et les caprins. Le bacille paratuberculeux, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, est une mycobactérie qui mesure 1 à 2 µm de long pour 0.5 µm de large, immobile, aérobie (ou microaérophile), non capsulée et non sporulée. Ce sont des bactéries Gram positif possédant une paroi particulière riche en lipides qui leur confèrent une propriété d'acido-alcool-résistance commune à toutes les mycobactéries. Ainsi leur identification n'est pas possible par la coloration de Gram classique et nécessite la coloration de Ziehl-Neelsen. A la différence des autres espèces de mycobactéries, *Map* est une bactérie intracellulaire-stricte, incapable de synthétiser la mycobactine, un facteur de croissance commun à toutes les mycobactéries leur permettant de capter le fer. La culture du bacille de Johne est difficile et lente, et nécessite des milieux spécifiques tels que le milieu de Herrold, auxquels il faut obligatoirement ajouter la mycobactine. Les colonies bactériennes n'apparaissent qu'après plusieurs semaines de culture, notamment pour les souches S (de six à seize semaines, parfois plus). En effet, dans les meilleures conditions de culture, on compte un temps de doublement de la colonie d'environ 1.4 jour comparativement à environ 2 heures pour une mycobactérie à croissance rapide tel que *M. smegmatis* (Elguezabal et al., 2011 ; Stephan et al., 2005). La séquence complète du génome de *Map* a été décrite dans une étude américaine (Li et al., 2005). La souche K-10, isolée dans les années 1970 à partir d'un bovin atteint de paratuberculose clinique, a permis de décrire un chromosome circulaire unique de 4 829 781 paires de bases avec une teneur élevée en Guanine et Cytosine (69.3%). Environ 1.5% du génome est composé de motifs d'ADN répétitifs tels que des séquences d'insertions, de gènes dupliqués ou de familles multigéniques. Lors de leurs analyses, les auteurs ont identifié plusieurs

séquences d'insertion spécifiques à *Map* : la séquence IS900 (17 copies), la séquence IS1311 (7 copies) ou encore la séquence ISMav2 (3 copies) ou F57 (1 copie). La séquence d'insertion IS900 est la cible la plus recherchée pour l'amplification génétique pratiquée lors des protocoles de détection de *Map* par Polymerase Chain Reaction (PCR).

L'évolution de l'infection par *Map* conduisant à la paratuberculose est longue et connaît plusieurs phases (Sweeney, 2011). Dans un premier temps l'animal se contamine durant ses premiers mois de vie principalement par voie orale. Il semblerait que la dose nécessaire soit plus faible chez les jeunes animaux. Pour un modèle d'infection expérimentale par voie orale sur des veaux de moins d'un mois, Sweeney *et al.* (2006) ont établi qu'il fallait que l'animal ingère au moins  $1.5 \times 10^6$  Unité Formant Colonie (UFC) pour déclarer la maladie et les lésions (Sweeney *et al.*, 2006), mais des doses infectieuses plus faibles ont été reportées dans des études plus anciennes,  $10^3$  UFC, (J.G. Brotherston *et al.*, 1961). Une autre étude a montré qu'une inoculation par voie orale avec  $5 \times 10^7$  UFC sur des veaux plus âgés (mais d'âge inférieur à 12 mois) était suffisante pour observer des lésions tissulaires liées à *Map* (Mortier *et al.*, 2015). S'en suit une phase de latence durant plusieurs mois voire plusieurs années au cours de laquelle la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte est principalement mobilisée et où aucune excrétion fécale de *Map* n'est détectable. L'animal rentre ensuite dans la phase subclinique, pendant laquelle la présence de *Map* dans les tissus lymphoïdes digestifs induit une réaction inflammatoire granulomateuse locale. Cette réaction produit des lésions focales qui s'étendent petit à petit. L'excrétion de *Map* est alors intermittente et une réponse immunitaire humorale est parfois détectable. Les signes cliniques ne sont pas décelables, les lésions intestinales s'étendent et l'infection se propage vers d'autres organes. En phase clinique, l'animal conserve son appétit mais les lésions granulomateuses étendues conduisent à une malabsorption et des diarrhées sévères en fin d'évolution, peu présentes chez les ovins. L'animal perd du poids et sa productivité chute considérablement, il est alors constamment excréteur fécal massif et séropositif. En phase terminale l'animal est moribond, cachectique et finit par mourir.

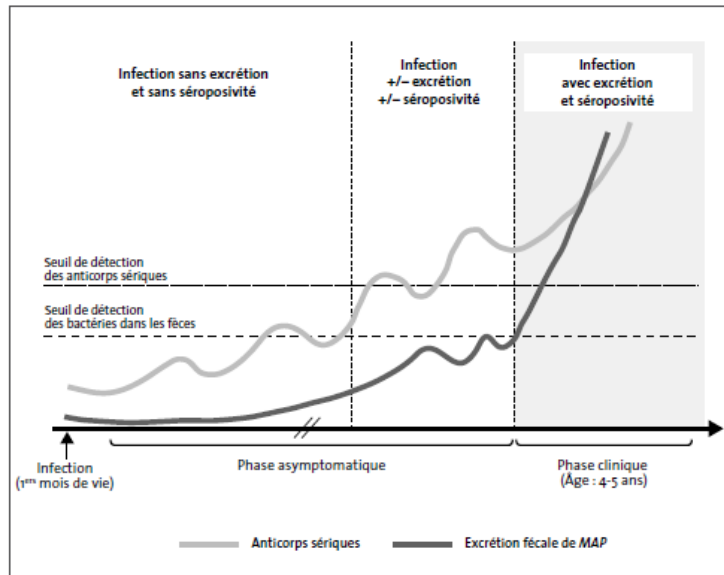


Figure 1 : Evolution de l'excrétion fécale et de la sérologie au cours d'une infection par *Map* (D'après l'AFSSA, 2009)

Les lésions macroscopiques se localisent principalement sur la partie terminale de l'intestin grêle, notamment au niveau de l'iléon et peuvent s'étendre au jéjunum et au caecum. Ces lésions sont décrites comme une entérite chronique hypertrophiante. La paroi est épaissie conduisant à la malabsorption des nutriments et donc au dépérissement de l'animal. Chez les bovins est décrit le stade encéphaloïde des lésions, correspondant à la présence de bourrelets transversaux et longitudinaux sur la muqueuse intestinale et ne s'effaçant pas à la traction. Le tissu lymphoïde digestif est le siège des lésions avec une hypertrophie marquée des nœuds lymphatiques mésentériques. D'un point de vue microscopique, les lésions sont classées en 5 grands groupes (González et al., 2005). Les lésions focales qui sont décrites comme de petits granulomes présents dans les nœuds lymphatiques iléaux et jéjunaux ou dans le tissu lymphoïde iléo-caecal. Plus précisément, ces granulomes sont bien délimités et formés de macrophages avec un cytoplasme abondant et un gros noyau doté d'une chromatine clairsemée. Les lésions multifocales sont caractérisées par la présence de petits granulomes bien délimités non seulement dans le tissu lymphoïde comme dans les lésions focales, mais aussi dans la *lamina propria* de l'intestin. De plus, les granulomes sont accompagnés de cellules géantes de Langhans (cellules géantes formées par la fusion de cellules épithélioïdes rencontrées dans le cas de réaction granulomateuse). Ces lésions sont entourées d'un fin infiltrat lymphoplasmocytaire localisé dans les villosités intestinales. Le nombre de ces lésions n'est pas assez important pour modifier la structure intestinale et causer l'entérite granulomateuse diffuse, mais cause cependant un léger épaississement. Les lésions diffuses se manifestent chez les animaux par la présence d'une entérite chronique granulomateuse sévère,

un infiltrat inflammatoire est présent dans différentes parties de l'intestin grêle causant un épaissement pariétal franc. Les lésions diffuses sont classées en 3 sous-catégories. Les lésions diffuses multibacillaires caractérisées par un infiltrat majoritairement composé de macrophages, ponctué de lymphocytes et de petites cellules géantes de Langhans qui touche la muqueuse, la sous muqueuse et peut atteindre la musculature. De plus, la coloration de Ziehl-Neelsen révèle la présence en grande quantité de mycobactéries dans les différentes portions intestinales affectées ainsi que dans les nœuds lymphatiques. Les lésions diffuses paucibacillaires quant à elles, sont caractérisées par un infiltrat majoritairement composé de lymphocytes auxquels se mêlent des macrophages et quelques cellules de Langhans. Les mycobactéries ne sont mises en évidence que de manière sporadique et en très faible quantité. Les lésions diffuses intermédiaires où l'infiltrat est mixte sont composées de macrophages, de lymphocytes et de cellules géantes de Langhans. La richesse cellulaire varie entre différents prélèvements sur un même animal. La quantité de mycobactéries observée est elle aussi intermédiaire.

Le bacille de Johne a une grande capacité de résistance dans le milieu extérieur, avec une persistance de plusieurs mois dans les fèces, le lisier, le sol ou encore l'eau (Jorgensen, 1977 ; Whittington et al., 2005 ; 2004). Cette capacité de résistance dans le milieu extérieur rend l'élimination de la maladie difficile et le risque de contamination par transmission horizontale indirecte très élevé. Le milieu de vie des animaux est la source de contamination majeure par le biais de la voie oro-fécale. D'autres modes de contamination, par ingestion de colostrum ou de lait contaminé (Khol et al., 2013 ; Stabel et al., 2014 ; Sweeney et al., 1992), par voie transplacentaire (Whittington, Windsor, 2009) ou par voie respiratoire par le biais de poussières ou d'aérosols contenant *Map* (Eisenberg et al., 2013) sont possibles mais d'une importance épidémiologique moindre. Comme la plupart des mycobactéries, *Map* est résistante aux désinfectants couramment employés. Elle est cependant sensible à certains désinfectants comme le formol à 5%, l'eau de Javel à 10% et le sulfate de cuivre à 5%. *Map* est résistante à de nombreux antibiotiques, dont ceux utilisés couramment en médecine vétérinaire bovine. Les études se multiplient pour trouver un traitement efficace contre cette mycobactérie. D'après l'étude de Zanetti *et al.* (2006) menée *in vitro* sur des souches de *Map* isolées chez des bovins entre autres, les antibiotiques avec les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) les plus basses sont la streptomycine, la rifabutine, la rifampicine et la ciprofloxacine (Zanetti et al., 2006). Plus récemment, une synergie entre antibiotiques connus comme ayant un effet sur les mycobactéries a été mise en évidence. C'est le cas pour le RHB-



104, une formule à base de 63.3% de clarithromycine, 6.7% de clofazimine et 30% de rifabutine. L'association de ces 3 antibiotiques a, *in vitro*, une CMI plus faible que chaque antibiotique utilisé séparément. Il faut garder à l'esprit que tous ces résultats sont obtenus *in vitro* et qu'ils ne sont donc pas directement applicables au vivant. Les traitements envisagés ci-dessus sont impraticables chez les ruminants, d'une part par leurs effets encore aléatoires et d'autre part par le coût prohibitif et la difficulté de mise en place de tels traitements. Les antibiotiques en question sont par ailleurs réservés à l'espèce humaine. De tels traitements ne se justifient donc pas pour traiter la paratuberculose qui plus est dans le contexte actuel d'émergence de résistances aux antibiotiques, une proposition de traitement reste donc pour l'instant illusoire.

La paratuberculose est considérée comme une "maladie d'achat", c'est à dire qu'elle est le plus fréquemment introduite dans les élevages par l'achat d'un animal infecté en phase subclinique qui devient excréteur après introduction dans l'élevage. La principale source de contamination sont les fèces des animaux infectés et excréteurs. Un animal en phase clinique peut excréter  $10^8$  bacilles par gramme de fèces (Whittington et al., 2000). L'environnement, principalement le sol, est donc rapidement contaminé et devient la source majeure de contamination pour les congénères, phénomène accentué par les propriétés de résistance de *Map* dans l'environnement. Tout le matériel, les aliments, les trayons sont susceptibles d'être contaminés et d'être une source de contamination pour les autres animaux de l'élevage. L'excrétion fécale de *Map* commence avant l'apparition des signes cliniques et est inconstante. Ce phénomène a également été observé chez les veaux (van Roermund et al., 2007) : les veaux pourraient être excréteurs dès leur contamination (Corbett et al., 2017) et jusqu'à l'âge de 6 mois (phase dite d'excrétion précoce), l'excrétion ne serait ensuite pas détectable avant l'âge de 18 mois (phase d'excrétion tardive). Plus récemment, une étude suggère aussi que l'excrétion fécale de *Map* suivrait différentes phases (Mitchell et al., 2012) : une phase d'excrétion précoce non-obligatoire avant l'âge de 12 mois suivie d'une phase de portage sans excrétion pendant quelques mois, pour arriver à la phase d'excrétion tardive. L'intensité de l'excrétion évolue au cours de la progression de l'infection, elle varie entre quelques bactéries par gramme de fèces en début d'évolution et atteint  $10^4$  à  $10^8$  en phase clinique. Différentes études (Whitlock et al., 2000 ; Crossley et al., 2005) ont permis de catégoriser les animaux excréteurs en trois groupes sur la base des résultats de culture fécale : les animaux faibles excréteurs (<10 UFC/tube), les excréteurs modérés (10 - 50 UFC/tube) et les forts excréteurs (> 50 UFC/tube).

L'effet de l'âge et de la dose infectante est très bien documenté chez les ovins. Dans le cas des bovins, les jeunes animaux âgés de moins d'un mois sont les plus réceptifs à l'infection par *Map*, les adultes peuvent ingérer le bacille sans contracter la maladie (Payne, Rankin, 1961). Par conséquent, l'infection a plus souvent lieu durant les premiers mois de vie. Cependant, il semble que les adultes puissent s'infecter s'ils sont en présence d'individus fortement excréteurs (Pradhan et al., 2011). Ainsi une méta-analyse publiée en 2010 indique que les proportions d'animaux ayant développé des lésions compatibles avec la paratuberculose sont respectivement de 75%, 50% et moins de 20% lorsque l'âge d'exposition est de moins de 6 mois, entre 6 et 12 mois et plus de 12 mois (Windsor, Whittington, 2010).

En France, la paratuberculose n'est pas classée comme un danger sanitaire de première catégorie, elle n'est donc pas soumise à déclaration et il n'y a pas de plan de lutte national mis en place à l'heure actuelle. Depuis 2001, cette maladie est classée en liste B des maladies par l'Office International des Epizooties (OIE), c'est-à-dire qu'elle est considérée comme une maladie transmissible ayant une importance socio-économique et/ou de santé publique pour les animaux de compagnie et de production. Ce statut ne donnant pas lieu à la mise en place d'un plan de lutte officiel à l'échelle nationale, les données sur la répartition de cette maladie sont limitées. Les plans de maîtrise s'appuient sur le dépistage des animaux infectés excréteurs pour les éliminer de manière précoce, combiné à des mesures d'hygiène strictes visant à réduire l'exposition des jeunes animaux aux différentes sources infectieuses. Ces plans d'assainissement ne s'avèrent pas totalement efficaces et sont très contraignants à mettre en place. De plus, une fois l'environnement des animaux souillé, le bacille persiste pendant plusieurs semaines à plusieurs mois, permettant l'infection de nouveaux animaux après élimination des excréteurs. Actuellement, ces plans de lutte permettent de diminuer la prévalence de la maladie sans permettre d'assainir un troupeau.

Différents tests diagnostiques *ante-mortem* peuvent être mobilisés pour mettre en évidence une infection par *Map*. Le test diagnostique de référence standardisé est la coproculture. Cependant elle ne permet de détecter que les individus infectés et excréteurs. L'excrétion étant intermittente et d'intensité variable, le dépistage précoce des individus est impossible avec cette méthode. De plus, la culture de *Map* prend plusieurs semaines et n'est donc pas compatible avec un dépistage de routine en élevage. Une autre alternative est d'avoir recours aux méthodes de détection indirectes en mesurant par exemple la réponse immunitaire humorale. Le test utilisé en France en routine pour dépister les animaux en élevage est la sérologie ELISA mettant en évidence les anticorps anti *Map*. La séroconversion des animaux

infectés est cependant tardive, conduisant à de nombreux faux négatifs en début d'infection. Les animaux vrais positifs sont en majorité des animaux déjà en phase d'excrétion voire en phase clinique. Le dépistage par ELISA ne permet donc pas une identification précoce des animaux représentant un risque infectieux, ce qui explique en partie l'échec des plans de lutte visant à assainir les élevages infectés basés uniquement sur la réforme précoce de ces animaux. La sensibilité épidémiologique pour le dépistage individuel des animaux infectés est mauvaise, avec des valeurs allant de 27.8 à 48.9% (Collins et al., 2005). La sensibilité est supérieure pour la détection des cas cliniques (>90%). Ce test bénéficie cependant d'une spécificité bonne à très bonne variant de 94.9 à 100% selon les études (Nielsen, Toft, 2008). Le test ELISA convient donc pour mettre en évidence la présence de *Map* au sein d'un troupeau (sauf en cas de faible prévalence d'infection), mais pas pour certifier qu'un individu isolé n'est pas infecté. Une autre méthode permettant de mettre en évidence une infection par *Map* est la PCR. Ce test permet de révéler la présence de *Map* dans un échantillon biologique par détection et amplification d'une séquence d'ADN cible. Dans le cas de la paratuberculose la PCR est réalisée sur fèces, et si elle s'avère positive, l'animal est alors qualifié d'excréteur. La qPCR (PCR quantitative) est une variante de la PCR permettant en plus de quantifier le nombre de bacilles présent dans une quantité donnée de fèces. Encore une fois, ce test ne permet qu'un dépistage tardif de la maladie puisque l'animal est déjà en phase d'excrétion lors d'un résultat positif. Etant plus onéreuse que la méthode ELISA, la qPCR n'est donc pas couramment utilisée en routine pour le dépistage des animaux en élevage. La qPCR s'avère au moins aussi sensible que la coproculture (Aly et al., 2010) et tout aussi spécifique (Plain et al., 2014). La qPCR permet de détecter la présence de *Map* à partir de quelques bactéries par gramme de fèces (Bosshard et al., 2006). Cette méthode est considérée comme ayant un haut débit de traitement des échantillons, donc moins chronophage et permettant le traitement de multiples échantillons à l'aide de plaques 96 puits (Espy et al., 2006).

Le dépistage et l'élimination précoce des animaux infectés, associés aux mesures d'hygiène et de conduite d'élevage visant à améliorer la biosécurité interne des cheptels atteints donnent des résultats aléatoires et souvent décevants. Le recours à la vaccination a depuis longtemps été un autre moyen de lutte contre la paratuberculose. Son objectif principal est de réduire ou de retarder l'expression clinique de la maladie. De plus, la vaccination vise à réduire l'excrétion fécale limitant ainsi la contamination de l'environnement. La méta-analyse de Bastida et Juste publiée en 2011 répertorie toutes les études disponibles en janvier 2010 à propos de l'efficacité de la vaccination dans le contrôle de la paratuberculose (Bastida, Juste,

2011). Cette étude inclut plusieurs vaccins contre la paratuberculose et est réalisée chez les bovins, ovins et caprins. Les résultats sont donc classés par espèce et par efficacité du vaccin *i.e.* effets sur la clinique, sur l'excrétion ou sur les lésions microscopiques et/ou macroscopiques. Parmi les 118 études, 108 fournissent des résultats positifs. Sur les 45 expériences menées chez les bovins, 40 sont associées à un effet bénéfique. Dans 87% des cas, les bovins ont été vaccinés avant un mois d'âge. Il en ressort une réduction moyenne du nombre de cas cliniques de 96% (variation de -35 à -100% selon les études), une réduction moyenne du nombre d'excréteurs ou de la charge bactérienne de 72.6% (variation de +36 à -99%) et une réduction moyenne de l'intensité des lésions de 57.5% (variation de -17% à -58%). Il n'y a cependant que 5 études sur le vaccin Silirum® incluses dans cette méta-analyse et une seule étude a été publiée depuis cette méta-analyse de 2011 dans une revue internationale à comité de lecture (Alonso-Hearn et al., 2012). L'efficacité et l'intérêt de ce vaccin sont donc relativement peu évalués. En 2005, une étude menée sur 18 veaux infectés expérimentalement par voie orale, dont 10 ont reçu une injection de ce vaccin à l'âge de deux mois, a montré que la vaccination induit une forte réponse humorale à 90 jours post-vaccination et une réponse à médiation cellulaire au bout de 30 jours. Ces réactions sont significativement plus précoces et plus intenses que chez les individus non vaccinés. Un abattage d'une partie des veaux à 180 jours et 330 jours post-vaccination a permis de montrer que la vaccination réduisait de manière significative le nombre de granulomes induits par la maladie chez les animaux vaccinés. La sévérité des lésions était par ailleurs réduite chez les animaux vaccinés (uniquement des lésions focales, excepté chez un individu) alors que les animaux non vaccinés avaient des lésions multi focales ou diffuses (Muñoz M et al., 2005). Ces résultats sont en accord avec une autre étude de 2009 dans laquelle les veaux ont été vaccinés à l'âge de 14 jours puis infectés 14 jours après (Sweeney et al., 2009a). La réponse à médiation cellulaire induite était plus forte chez les animaux vaccinés et les cultures bactériennes (réalisées 12 semaines post-vaccination, 9 semaines post-inoculation) sur tissus digestifs montraient que la quantité de bactéries présentes dans ces tissus infectés était plus faible chez les bovins vaccinés. Cependant, la réponse humorale n'avait pas été détectée, sûrement à cause du jeune âge des animaux lors de la vaccination et de l'abattage. En 2009, il a aussi été montré que la vaccination contre la paratuberculose permettait d'augmenter la production laitière de 3,9% dans les élevages infectés (Juste et al., 2009). Cette étude montrait aussi une réduction de l'excrétion fécale, évaluée par coproculture, de 68% sur l'ensemble des individus vaccinés. Ces effets positifs ont été confirmés plus récemment en 2012 (Alonso-Hearn et al., 2012). Cette étude met en évidence une réduction significative de l'excrétion de

*Map* dans les fèces ainsi que la réduction du nombre de bactéries dans les tissus infectés. De plus, il est mentionné une augmentation du poids moyen des carcasses des animaux vaccinés et envoyés à l'abattoir lors de suspicion d'apparition clinique de la maladie.

Un des problèmes lié à la vaccination contre la paratuberculose bovine, est qu'il est impossible de différencier un individu vacciné d'un individu infecté à l'aide des tests sérologiques actuels. Le vaccin Silirum® contient une bactérie entière inactivée. Ainsi les anticorps produits suite à la vaccination ne diffèrent pas de ceux produits lors d'une infection naturelle. Même en connaissant le statut vaccinal d'un animal, il est donc impossible de savoir si un test ELISA positif est lié à une réponse humorale induite par la vaccination ou à une séroconversion faisant suite à une infection naturelle malgré la vaccination. La séropositivité post-vaccination apparaît fréquente et durable jusqu'à 7 ans pour d'autres vaccins comme le Mycopar® (Tewari et al., 2014), mais apparaît mal documentée pour le vaccin Silirum®. L'effet de l'âge à la vaccination au Silirum® sur la persistance de la réponse humorale semble lui aussi mal connu. Par ailleurs, en réduisant l'excrétion, la vaccination pourrait limiter la détection des animaux infectés par PCR ou coproculture. Suite à la vaccination contre la paratuberculose, les stratégies de dépistage et élimination des animaux séropositifs ou excréteurs sont donc difficiles à mettre en œuvre.

De plus, la vaccination contre la paratuberculose interfère avec le dépistage de la tuberculose bovine (Garrido et al., 2013). La vaccination augmente le nombre de faux positifs lors de dépistage de la tuberculose bovine par intradermotuberculation. Cette étude menée sur le vaccin Silirum® incluant 7 troupeaux (2 avec une stratégie de dépistage/renouvellement et 7 utilisant la vaccination) soit 2033 bovins vaccinés et 2252 non vaccinés indique qu'avant vaccination, 2.40% des animaux ont eu un test non négatif par intradermotuberculation simple (IDS). Après vaccination, 20.42% des animaux vaccinés ont eu un test IDS positif contre 0.75% pour les animaux non vaccinés. Par intradermotuberculation comparative (IDC) 0.58% des animaux vaccinés se sont révélés positifs contre 0.25% des animaux non vaccinés. Les animaux vaccinés étaient 17 fois plus à risque d'être positifs que les animaux non vaccinés lors de dépistage par IDS, et 4 fois plus à risque avec la méthode IDC. Il en convient donc que l'IDC est fortement recommandée pour le dépistage de la tuberculose bovine dans les élevages où la vaccination contre la paratuberculose est mise en œuvre afin de limiter le risque de faux négatifs. De nouveaux antigènes recombinants spécifiques de *Mycobacterium bovis* et de nouveaux critères d'interprétation ont récemment été proposés, permettant d'assurer une absence de faux positifs liés à la vaccination lors de l'IDC (Serrano et

al., 2017), mais ne sont pas pour le moment utilisés en routine. Dans ce contexte, compte tenu des conséquences lourdes liées aux cas positifs en IDC, la vaccination reste interdite en France chez les bovins sauf cas exceptionnels sous autorisation et contrôle des services vétérinaires (Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations, DDCSPP) (Arrêté du 18 août 2014 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins (JO 26/8/14)). Cette autorisation repose notamment sur un contexte d'élevage favorable vis-à-vis de la tuberculose.

Enfin, il est décrit une possible abcédation au point d'injection du vaccin. Cet effet secondaire est mentionné dans deux études menées sur le vaccin Silirum® (Sweeney et al., 2009a ; Muñoz M et al., 2005). Cette réaction est provoquée par la nature huileuse de l'adjuvant présent dans les vaccins contre la paratuberculose. Il semble cependant que la nature hautement raffinée des huiles minérales composant l'adjuvant du vaccin Silirum® limite significativement l'apparition de cette réaction au point d'injection (Rosseels, Huygen, 2008). Une abcédation au point d'injection reste cependant un effet secondaire mineur à côté des problèmes de dépistage des maladies, dues à une mycobactérie, cités plus haut et des résultats positifs décrits lors de l'utilisation de ce vaccin.

La vaccination à l'aide du vaccin Silirum® est possible en France depuis fin 2014, date d'obtention de son autorisation de mise sur le marché (AMM). Depuis cette date, la vaccination a été utilisée dans de nombreux troupeaux dans le cadre de plans de maîtrise de la paratuberculose. A l'heure actuelle, les études visant à évaluer les effets et les intérêts technico-économiques de la vaccination dans les élevages Français font défaut.

Dans ce contexte, l'objectif principal de notre étude était d'évaluer la situation épidémiologique vis-à-vis de la paratuberculose dans 8 troupeaux laitiers du département de la Meuse utilisant le Silirum®, et de comparer dans ces troupeaux le statut sanitaire d'animaux vaccinés et non vaccinés. Dans un premier temps, le présent rapport présentera de manière plus détaillée les objectifs ainsi que le schéma d'étude et les matériels et méthodes mis en œuvre. Les principaux résultats seront ensuite présentés et seront discutés dans une quatrième partie.

## I) CONTEXTE, NATURE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS

Parmi près de 1380 élevages dont 680 élevages laitiers (49%) et un cheptel total d'environ 219 000 bovins dont 45 000 vaches laitières (20%) les élevages laitiers du département de la Meuse s'avèrent fortement touchés par la tuberculose. Au sein des 171 élevages de la Meuse engagés dans un plan d'assainissement de la paratuberculose comprenant un dépistage sérologique par an, 17 élevages sont engagés dans un protocole de vaccination qui s'insère dans les plans de maîtrise classiques de la paratuberculose décrits en introduction. En collaboration avec le Groupement de Défense Sanitaire (GDS) et le Groupement Technique Vétérinaire (GTV) de la Meuse, l'UMR INRA-ENVT 1225 IHAP réalise une étude visant à évaluer les conséquences de la vaccination contre la paratuberculose dans une partie des élevages infectés. Les principaux objectifs de cette étude sont d'étudier l'effet de la vaccination dans des troupeaux infectés par *Map* sur (i) la réponse sérologique (ii) l'excrétion de *Map* dans les fèces et le lait (iii) les paramètres technico-économiques des élevages. Notre travail, que synthétise le présent rapport portait uniquement sur la réponse sérologique et l'excrétion fécale de *Map*.

## II) MATERIEL ET METHODES

### II.1) Population d'étude

#### II.1.1) Elevages

Les 8 élevages inclus dans notre étude se situent dans le département de la Meuse (département 55) de la région du Grand Est. Le département compte environ 680 élevages laitiers et un cheptel de 45 000 bovins produisant en moyenne 480 000 litres de lait par an et par élevage. La race Prim'Holstein (PH) est majoritairement présente dans le département.

Le plan de maîtrise de la paratuberculose mis en place par le Groupement de Défense Sanitaire de la Meuse (GDS 55) comporte plusieurs niveaux : certification, maîtrise et vaccination. Les 8 élevages inclus dans notre étude font partie des 17 élevages ayant entrepris un programme de vaccination, ayant mis en place la vaccination entre 2015 et 2016 et ayant accepté de participer à l'étude. Les résultats des analyses sérologiques réalisées dans ces élevages lors des 3 campagnes de prophylaxie précédentes (2014-2015, 2015-2016 et 2016-2017) ont été exploités afin de calculer une incidence sérologique annuelle (nombre de bovins nouvellement séropositifs sur nombre de bovins de plus de 24 mois testés chaque année). Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : incidence sérologique annuelle vis-à-vis de la paratuberculose sur les campagnes 2014 à 2017 dans les 8 élevages inclus dans l'étude, calculées d'après les résultats de prophylaxie

Elevage	2014-2015		2015-2016		2016-2017	
	positif/testés	incidence (%)	positif/testés	incidence (%)	positif/testés	incidence (%)
ELEVAGE A	12/239	5.02	11/201	5.47	9/286	3.15
ELEVAGE B	21/152	13.82	3/166	1.81	0/162	0.00
ELEVAGE C	16/160	10.00	10/157	6.37	4/165	2.42
ELEVAGE D	13/179	7.26	8/157	5.10		
ELEVAGE E	15/150	10.00	7/175	4.00	14/167	8.38
ELEVAGE F	5/48	10.42	3/44	6.82	5/52	9.62
ELEVAGE G	13/163	7.98	26/200	13.00		
ELEVAGE H	8/194	4.12	7/78	8.97		



Sur les 3 campagnes de prophylaxie, 5 élevages parmi les 8 ont eu les 3 séries de prélèvements contre 2 séries pour les 3 autres élevages (absence de prélèvements pour la campagne 2016-2017). Sur les 3 campagnes, les incidences sérologiques annuelles variaient entre 0% et 13.8%. Une réduction significative de l'incidence sérologique est observée entre 2014 et 2017 pour l'élevage B ( $p < 10^{-6}$ ) et l'élevage C ( $p = 0.005$ ). Pour les autres élevages, les valeurs ne diffèrent pas significativement entre les 3 campagnes et restent à des niveaux élevés.

#### II.1.2) Programme de maîtrise et de vaccination vis-à-vis de la paratuberculose

Pour un engagement dans un protocole de vaccination paratuberculose, l'éleveur doit en faire la demande écrite auprès de la DDSCPP. Cette demande doit être justifiée par des résultats de prophylaxie défavorables depuis plusieurs années et des cas cliniques de paratuberculose avérés. L'éleveur obtient une dérogation au dépistage de la tuberculose bovine lors de la prophylaxie annuelle et des mouvements d'animaux si son élevage correspond aux critères suivants :

- Le taux de rotation annuel du cheptel des trois dernières années est inférieur à 40 %,
- Le troupeau n'a pas été reconnu atteint de tuberculose bovine dans les dix dernières années,
- Aucun lien épidémiologique à risque n'a été constaté, dans les 3 dernières années, avec un cheptel atteint de tuberculose bovine,
- Aucun lien épidémiologique à risque n'a été constaté, dans les 3 dernières années, avec un foyer confirmé de tuberculose dans la faune sauvage, en particulier les bovins du cheptel XXXXXXXXXXXXXXX n'ont pas été mis en pâture dans une zone « à risque de tuberculose bovine » du département telle que définie dans l'article 3 de l'arrêté préfectoral des Ardennes sur la gestion de la tuberculose bovine,
- Le troupeau ne livre pas directement au consommateur du lait cru ou des produits au lait cru.

Une visite conjointe du vétérinaire sanitaire et du GDS, est alors organisée dans l'élevage pour répondre à cette demande. Un audit d'élevage est réalisé afin de relever les facteurs à risque de transmission et de proposer des mesures de biosécurité internes et externes. Durant cette visite, il est également déterminé quels animaux vacciner. La

vaccination est habituellement réservée aux jeunes femelles âgées de moins de 6 mois, idéalement entre 1 et 3 mois d'âge. Lorsque la prévalence observée de la maladie est élevée (sur la base des résultats sérologiques), les vaches adultes dépistées séropositives peuvent aussi être vaccinées. Le protocole vaccinal consiste en une injection sous-cutanée d'une dose de vaccin Silirum®.

Une visite conjointe (GDS, éleveur, vétérinaire) est reprogrammée tous les deux ans afin de vérifier la mise en place effective des mesures de maîtrise, la réponse aux objectifs fixés et valider le maintien du protocole.

Enfin, les bovins non vaccinés de plus de 24 mois doivent être testés annuellement en sérologie. Selon les résultats certains bovins peuvent être vaccinés : les bovins fortement positifs (Pos +++ ou Pos +++) doivent être réformés dans les 6 mois. Ceux qui sont faiblement positifs (Pos + ou ++) peuvent être recontrôlés par PCR sur fèces, et en cas de résultat négatif peuvent être vaccinés. Ils feront dès lors l'objet d'un suivi annuel par PCR sur fèces. Ces cas sont très peu nombreux (7 vaches sur la période 2014-2017 dans les 8 troupeaux suivis).

### II.1.3) Effectifs et prélèvements

#### II.1.3.1) Modalités de prélèvements

Pour des raisons de logistique et de coût, il n'était pas envisageable d'évaluer le statut de tous les bovins adultes présents dans les troupeaux inclus. Compte tenu de la cinétique d'excrétion de *Map*, les animaux à inclure dans l'étude devaient être en deuxième lactation (âgés de 36 mois minimum) dont la réforme n'était pas prévue pendant la période de prélèvement de Mai 2018 à Avril 2019. Ce sont des animaux encore jeunes pour lesquels l'excrétion de *Map* dans les fèces est probable s'ils sont infectés et qui représentent une proportion importante des effectifs, comparativement aux bovins plus âgés.

Sur chaque animal inclus ont été réalisés :

– un prélèvement de fèces, directement dans le rectum, d'environ 10 à 15 grammes, à l'aide d'un gant de fouille à usage unique. Les fèces ont été immédiatement transférées dans des sachets identifiés par un code d'élevage et le numéro de travail de la vache.

– une prise de sang sur tube sec de 10 mL à la veine caudale. Les tubes étaient identifiés par les mêmes codes. Après centrifugation, le sérum était directement transmis en plaque de 96 puits, dont les plans ont été dressés à partir des codes d'élevage et des numéros de travail des vaches. Les plaques ont été préparées en double.

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

### II.1.3.2) Effectifs prélevés au total

Au total 486 bovins ont été prélevés entre avril 2018 et avril 2019 :

- 266 bovins prélevés en avril 2018 (184 non vaccinés et 82 vaccinés),
- 266 bovins prélevés en octobre 2018 (172 non vaccinés et 94 vaccinés),
- 265 bovins prélevés en avril 2019 (96 non vaccinés et 169 vaccinés)

Sur ce laps de temps, 207 bovins furent prélevés à une seule date, 247 prélevés à 2 dates, 32 prélevés aux 3 dates.

Tableau 2 : nombre de prélèvements par animaux prélevés et par élevage

ELEVAGE	Prélevé 1 seule fois	Prélevé 2 fois	Prélevé 3 fois	Total
Elevage A	46	43	4	93
Elevage B	16	44	3	63
Elevage C	35	0	0	35
Elevage D	30	39	2	71
Elevage E	14	35	2	51
Elevage F	15	18	0	33
Elevage G	27	49	15	91
Elevage H	24	19	6	49
Total	207	247	32	486
	42,6%	50,8%	6,6%	100,0%

*Note : Elevage C : animaux présents uniquement en mai 2018*

### II.1.3.3) Effectifs prélevés selon le statut vaccinal

Au total, les effectifs des bovins vaccinés et non vaccinés sont équilibrés. Mais alors que seul un quart des bovins non vaccinés n'a fait l'objet que d'un seul prélèvement, c'est le

cas pour plus de 60% des bovins vaccinés. La connaissance du statut infectieux est donc plus incertaine chez ces animaux.

Tableau 3 : nombre de prélèvements en fonction du statut vaccinal des animaux

Vacciné	Prélevé 1 seule fois	Prélevé 2 fois	Prélevé 3 fois	Total
Non	62 <i>24.9</i>	171 <i>68.7</i>	16 <i>6.4</i>	249
Oui	145 <i>61.2</i>	76 <i>32.1</i>	16 <i>6.8</i>	237
Total	207	247	32	486

*En italique les pourcentages par statut vaccinal*

A l'exception de l'élevage E, les effectifs de bovins vaccinés sont supérieurs à 10, avec 2 groupes qui se dégagent : les élevages avec moins de 20 bovins vaccinés prélevés (3 élevages) et les élevages avec entre 33 et 66 bovins vaccinés prélevés (3 élevages). Les effectifs d'animaux vaccinés prélevés au moins 2 fois sont faibles pour 4 élevages (Elevage A, n=2, Elevage B, n=3, Elevage E, n=1, Elevage F, n=5). Ils limitent les comparaisons intra-élevage entre les animaux vaccinés et non vaccinés.

Tableau 4 : répartition des effectifs au sein des élevages selon le nombre de prélèvements et le statut vaccinal

Elevage	Non vacciné			Vacciné		
	Prélevé 1 seule fois	Prélevé 2 ou 3 fois	Total	Prélevé 1 seule fois	Prélevé 2 ou 3 fois	Total
Elevage A	14	45	59	32	2	34
Elevage B	6	44	50	10	3	13
Elevage C	16	0	16	19	0	19
Elevage D	4	16	20	26	25	51
Elevage E	7	36	43	7	1	8
Elevage F	7	13	20	9	5	14
Elevage G	5	20	25	22	44	66
Elevage H	3	13	16	21	12	33
Total	62	187	249	145	92	237

## II.2) Analyses biologiques

### II.2.1) Evaluation du statut sérologique par ELISA

Le statut sérologique de chaque vache a été évalué à l'aide d'un kit ELISA (ID Screen® Paratuberculosis Indirect, ID.Vet, Montpellier, France) à l'UMR 1225 INRA/ENVT IHAP. Ce kit met en évidence les anticorps dirigés contre *Map*. Il peut être utilisé sur des échantillons de sérums ou plasmas de caprins, ovins et bovins ou sur du lait de bovin. Le kit ELISA comprend une plaque de 96 puits sensibilisée avec de l'extrait purifié de *Map*. Au fond de chaque puits se trouvent des antigènes de *Map* sur lesquels vont pouvoir se fixer des anticorps anti-antigène de *Map*, présents dans les échantillons de sérums.

Le test ELISA comporte 4 étapes principales :

- Pré-incubation : afin d'éviter des réactions croisées, les échantillons à tester et les contrôles sont pré-incubés dans un tampon neutralisant contenant *Mycobacterium phlei*, avant d'être transférés sur les plaques sensibilisées.
- Fixation de l'anticorps recherché : cette étape consiste à incuber les sérums obtenus, ainsi que les contrôles négatifs et positifs. A cette étape, les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes qui se trouvent au fond des puits. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés. Une étape de fixation longue a été choisie (une nuit entre 16 et 20 heures) afin de maximiser la sensibilité du test. Une étape plus courte (45min +/- 4min) est aussi proposée par le fabriquant.
- Fixation de l'anticorps de détection : cette étape consiste à ajouter dans chaque puits des anticorps secondaires couplés à une peroxydase (le conjugué). Ce conjugué va reconnaître l'anticorps primaire recherché. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- Révélation : cette étape consiste à incuber un substrat spécifique à l'enzyme peroxydase qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés. Cette étape de révélation est stoppée par une solution d'arrêt qui induit une coloration jaune (figure 2).

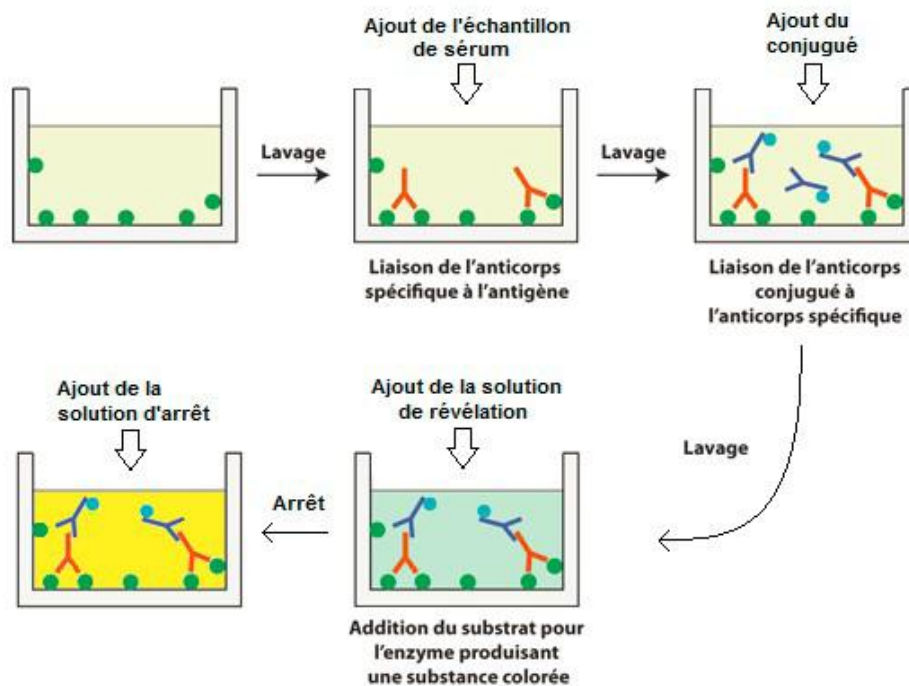


Figure 2 : étapes du test ELISA

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

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

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

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

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

Tableau 5 : interprétation du test ELISA en fonction de la valeur S/P

Résultat	Statut
$S/P \% \leq 60 \%$	NEGATIF
$60 \% < S/P \% < 70 \%$	DOUTEUX
$S/P \% \geq 70 \%$	POSITIF

## II.2.2) Evaluation de l'excrétion de *Map* dans les fèces par qPCR

### II.2.2.1) Kit qPCR et principe

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

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

- Décongélation des fèces pendant une nuit
- Prélèvement de 10 grammes de fèces
- Mise en suspension dans 70 mL d'eau bidistillée
- Agitation et sédimentation pendant 20 min
- Concentration par filtration de 10 mL du surnageant avec un filtre ADIAFILTER
- Centrifugation (3000 G, 5 min) et récupération du culot
- Remise en suspension dans 500  $\mu$ L d'eau bidistillée
- Broyage du culot
- Transfert sur plaque

Ensuite, les acides nucléiques sont extraits puis purifiés. Pour cela, une étape de lyse cellulaire est réalisée à l'aide d'une protéinase K (digestion enzymatique). A cette étape, un contrôle externe d'extraction est inclus à nos échantillons. Celui-ci permet de vérifier les étapes d'extraction et d'amplification pour chaque échantillon. Le test est considéré comme validé s'il répond aux caractéristiques données dans le tableau 6.

Tableau 6 : critères de validation des résultats qPCR

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

\* FAM amplification : lecture entre 450-500nm

\*\* VIC amplification : lecture entre 523-568 nm

L'extraction est ensuite entièrement réalisée par l'automate KingFisher Flex. Celui-ci va capter les acides nucléiques à l'aide de billes magnétiques (purification). Suite à l'extraction, les extraits d'ADN peuvent être amplifiés. Pour cela, un mélange réactionnel est ajouté aux extraits d'ADN des échantillons, à la gamme (préparée à partir d'ADN pur) et aux contrôles. Puis, les échantillons sont amplifiés par le thermocycleur LightCycler 96.

Cette amplification comporte plusieurs étapes clés :

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

Les trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel le nombre de fragments d'ADN cible initial est normalement doublé.



Une quarantaine de cycles est effectuée dans notre expérience de qPCR. Ainsi, après 45 cycles, notre ADN cible est amplifié  $2^{45}$  fois.

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

La figure 3 résume les différentes étapes de l'amplification avec utilisation d'une sonde TaqMan.

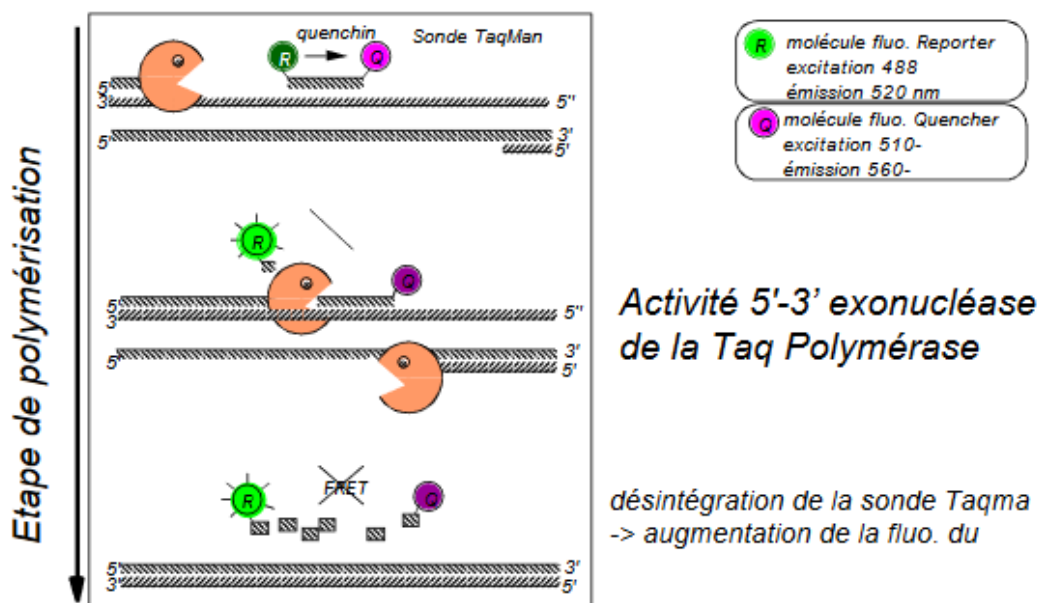


Figure 3 : Représentation des 3 étapes de la méthode Taqman (INRA Montpellier)

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la qPCR par le logiciel du LightCycler 96 et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Au cours du temps, la fluorescence d'une PCR en temps réel augmente en 3 phases distinctes :

- phase de bruit de fond : La quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée). La « ligne de base » (ou « base line ») correspond à ce bruit de fond et qualifie la partie non caractéristique des courbes observées pendant les premiers cycles de l'amplification
- phase exponentielle : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil. Il apparaît alors un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (« cycle seuil » ou « threshold cycle ») et apparaît en début de phase exponentielle. Pour obtenir le Ct, une « ligne de seuil » (« threshold line ») doit être placée au-dessus de la ligne de base, de préférence au point d'inflexion de la phase exponentielle d'amplification.
- phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

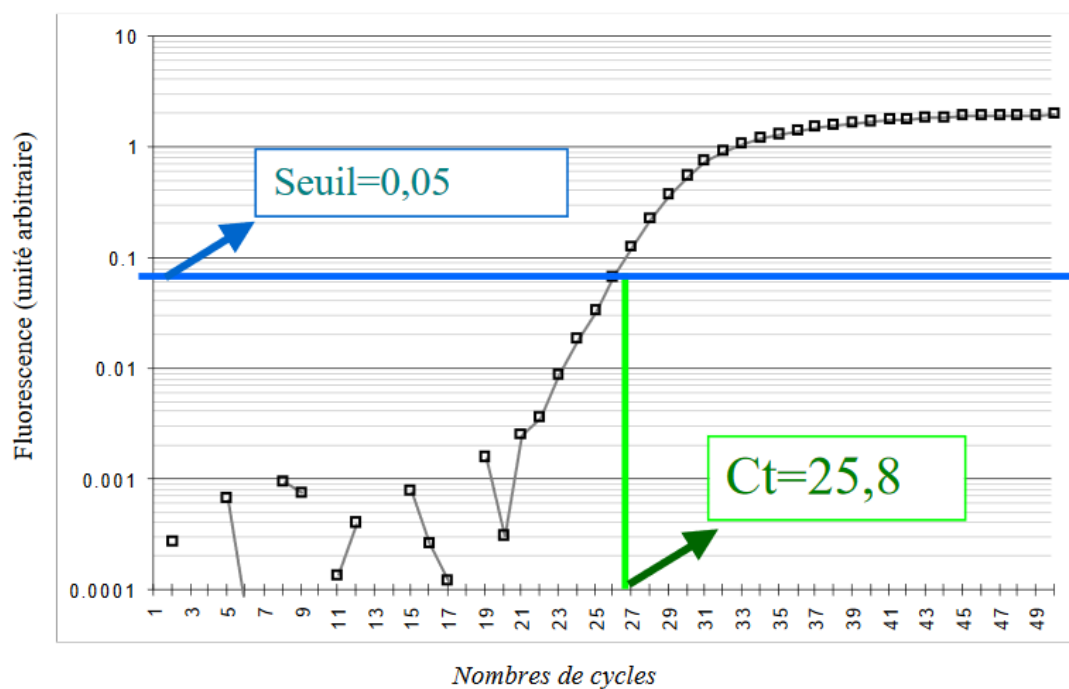


Figure 4 : Principes du Ct avec pour exemple un seuil de 0,05

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

#### II.2.2.2) Quantification de l'excrétion de *Map*

Une gamme de dilution a été réalisée afin d'évaluer la quantité de *Map* au sein des échantillons. Cette dernière a été conçue à partir d'ADN génomique de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (souche de référence K10 ATCC 19698, UMR INRA 311 ISP Nouzilly). Plusieurs dilutions au tiers de cet ADN stock ont été effectuées afin d'obtenir une gamme comportant 16 points (de  $10^8$  à 2 copies du gène IS900 par puits de PCR). La figure 5 montre les courbes de fluorescence obtenues pour cette gamme de dilution. Chaque concentration était présente 3 fois sur la plaque (triplicatas). Le tableau 6 donne les valeurs moyennes de Ct pour les principaux points de la gamme.

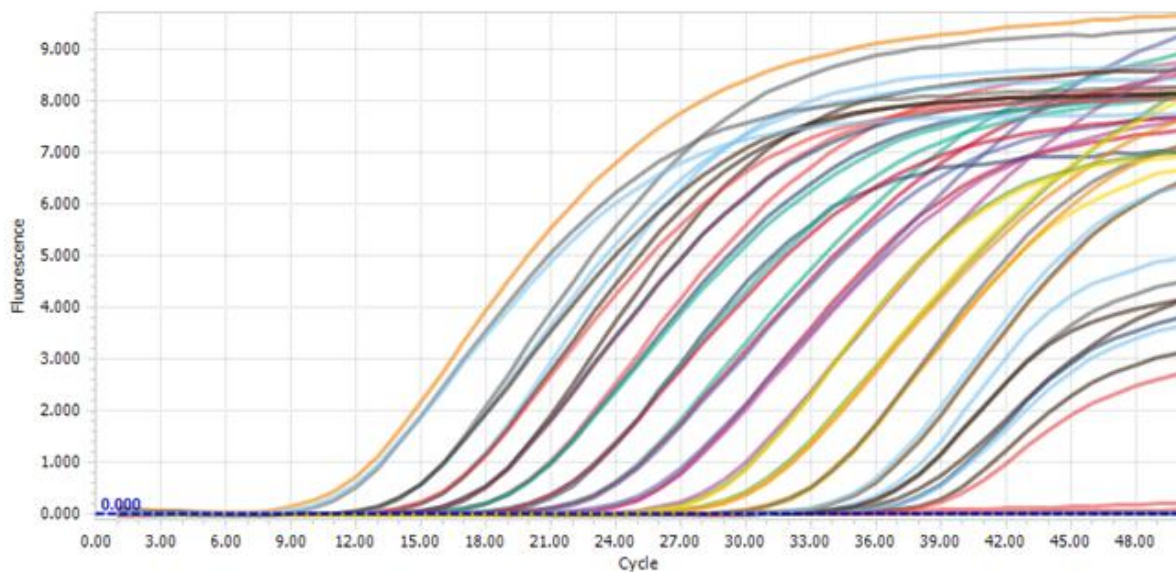


Figure 5 : courbes de fluorescence de la gamme de dilution (Light Cycler 96)

Tableau 7 : moyenne des Ct et coefficients de variation obtenus pour les principaux points de la gamme de dilution d'ADN purifié de la souche K10

N° du point de gamme	Concentration Is900 par puits	Moyenne Ct	Coefficient de variation (%)
1	10 <sup>8</sup>	7.89	13.85
2	10 <sup>7</sup>	11.48	0.78
4	1.11*10 <sup>6</sup>	14.40	1.47
6	1.23*10 <sup>5</sup>	17.92	1.67
8	1.37*10 <sup>4</sup>	22.09	2.34
10	1.52*10 <sup>3</sup>	26.20	1.26
12	1.69*10 <sup>2</sup>	31.89	0.10
14	18.8	35.82	2.59
15	6.27	34.31	2.16
16	2.09	Non détecté	-

Une régression linéaire appliquée à cette gamme, exprimant le Ct d'un point de gamme en fonction du logarithme du nombre de copies IS900 avant amplification (N<sub>0</sub>) permet d'obtenir le résultat présenté dans la figure 6. La corrélation est bonne entre ces deux paramètres (r<sup>2</sup>=0.9889).

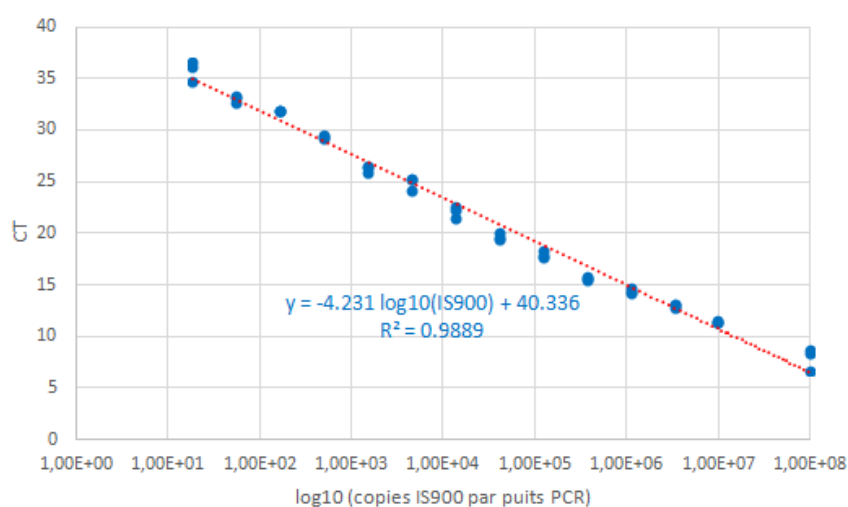


Figure 6 : Régression linéaire de Ct=f(Log(IS900)) réalisée à partir de la gamme de dilution d'ADN purifié de la souche K10

La droite de régression estimée par les moindres carrés est donnée par :

$$Ct = -4.231 \log_{10}(IS900) + 40.336$$

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, donc :  $Ct=40.336$ . Pour un équivalent génome de *Map* (18 copies d'IS900) par puits de PCR, on s'attend donc à un Ct de sortie de  $-4.23 * \log_{10}(18) + 40.336 = 34.9$ .

La relation inverse peut être utilisée pour estimer le nombre de génomes bactériens présents par puits de PCR et par gramme de fèces, en tenant compte d'un facteur de dilution de 42 lié à la préparation de l'échantillon de fèces et en faisant l'hypothèse d'une efficacité parfaite de l'extraction d'ADN. Cette relation est donnée par :

$$\text{Equivalent } Map / \text{ gramme de fèces} = 10^{(a*Ct+b)} / 18*42$$

Avec  $a = -1/4.231 = -0.2364$  et  $b = 40.336/4.231 = 9.5334$

Cette relation a été utilisée par la suite afin de quantifier les niveaux d'excrétion des bovins testés par qPCR.

### II.3) Analyse des données

Les échantillons biologiques ont été identifiés par une clef primaire permettant de faire un lien avec les résultats d'analyses (sérologie et qPCR) et le N° d'identification des bovins. Des analyses descriptives simples ont été réalisées à l'aide d'indicateurs classiques (fréquences, moyennes).

Les comparaisons statistiques ont fait appel, dans le cas univarié, à des tests de Chi<sup>2</sup> ou de Fisher pour les variables catégorielles et des tests de Student ou de Mann-Whitney-Wilcoxon pour les variables quantitatives.

Les analyses multivariées ont fait appel à des modèles de régression linéaire généralisée à effets aléatoires vache et élevage pour tenir compte du regroupement des vaches au sein de mêmes troupeaux et du fait que certaines vaches avaient été prélevées plusieurs fois.

Dans l'ensemble des analyses, le seuil de risque alpha de 5% a été retenu. L'ensemble des analyses a été réalisé avec le logiciel R en faisant appel au package lme4 pour les modèles de régression linéaire généralisée.

### III) RESULTATS

#### III.1) Age des bovins prélevés et âge à la vaccination

La figure ci-dessous présente la distribution des âges, en mois, au 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> prélèvement pour les bovins vaccinés et non vaccinés. Les statistiques descriptives sont présentées dans le tableau suivant.

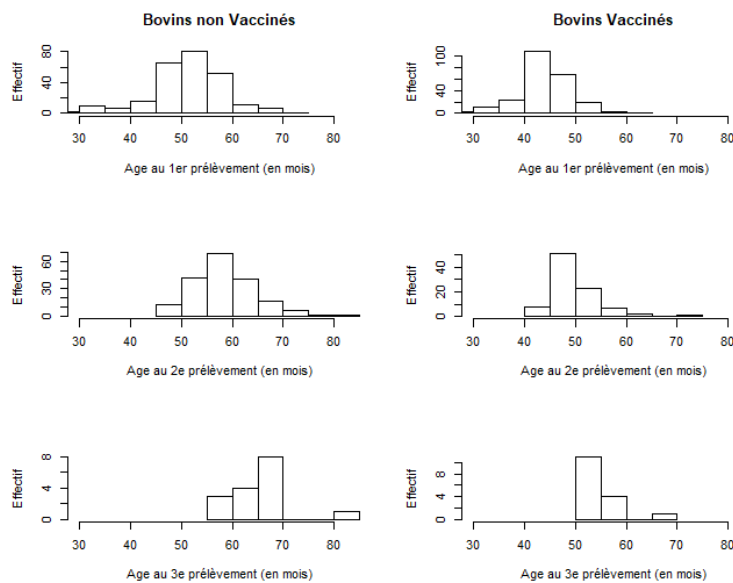


Figure 7 : âge en mois des bovins vaccinés et non vaccinés au moment des 3 séries de prélèvements

Tableau 8 : statistiques descriptives du nombre de prélèvements en fonction des âges

	Vaccinés	Effectif	1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	3 <sup>e</sup> quartile
1 <sup>er</sup> prélèvement	Non	249	48	52	56
	Oui	237	42	44	47
2 <sup>e</sup> prélèvement	Non	187	55	58	62
	Oui	92	48	50	52
3 <sup>e</sup> prélèvement	Non	16	62	66	67
	Oui	16	54	54	56

En médiane, les bovins non vaccinés étaient plus âgés de 8 mois que les bovins vaccinés à chaque date de prélèvement.

La figure suivante présente la distribution des âges (en mois) des 237 bovins vaccinés.

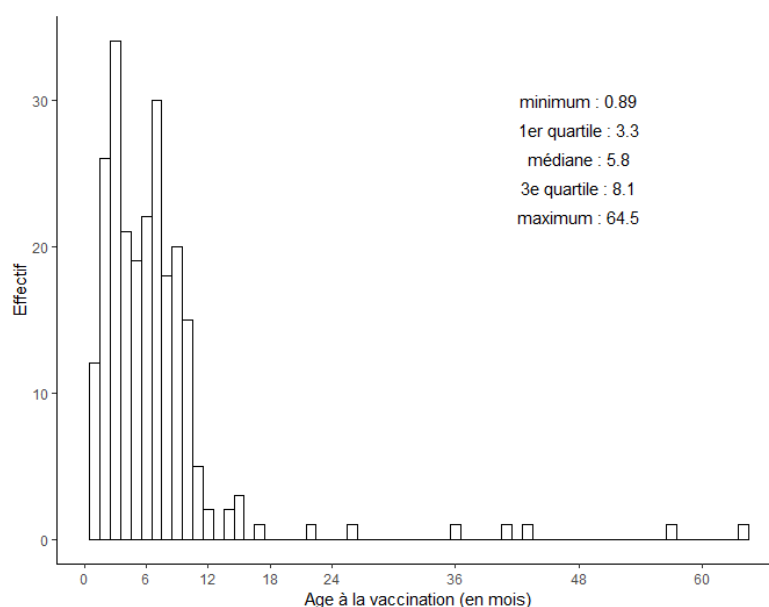


Figure 8 : distribution des âges (en mois) des 237 bovins vaccinés

Plus de la moitié des bovins vaccinés (126 sur 237, soit 53.16%) l'a été avant l'âge de 6 mois, et 94.5% (n=224) l'ont été avant 1 an. L'âge minimal à la vaccination était de 27 jours et six bovins ont été vaccinés à deux ans et plus. Entre l'âge de 1 et 8 mois, la répartition est globalement homogène, avec entre 20 (8.5%) et 35 (14.9%) bovins vaccinés par intervalle de 1 mois d'âge.

### III.2) Résultats d'examens de laboratoire disponibles

Tableau 9 : effectifs et nombre d'analyses

Vaccinés	1 sérologie 1 qPCR	2 sérologies 2 qPCR	3 sérologies 3 qPCR	2 sérologies 1 qPCR	Total
Non	64	166	16	3	249
Oui	145	76	16	0	237
Total	209	242	32	3	486

Dans l'ensemble, les prélèvements et leur traçabilité ont été bons. Pour 2 vaches de l'élevage G et 1 vache de l'élevage B, les échantillons de fèces étaient manquants.

### III.3) Résultats des analyses biologiques

#### III.3.1) Sérologie ELISA paratuberculose : 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> sérologies

Le tableau 10 présente les résultats de la première et de la deuxième sérologie ELISA sur l'ensemble des bovins.

Tableau 10 : résultats des premières et deuxièmes sérologies

		Sérologie 2				Total
		Négatif	Douteux	Positif	ND	
Sérologie 1	Négatif	227	<b>3</b>	<b>17</b>	156	403
	Douteux	<b>3</b>	<b>1</b>	0	<b>7</b>	<b>11</b>
	Positif	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>19</b>	<b>46</b>	<b>72</b>
	Total	235	<b>6</b>	<b>36</b>	209	486

\* ND = non déterminé

Sur les 486 bovins testés au moins une fois, 89 (18.3%) ont eu au moins un résultat positif et 16 autres (3.3%) ont eu au moins un résultat douteux.

Sur les 277 bovins testés au moins 2 fois en sérologie :

- 227 (81.9%) sont négatifs aux 2 dates
- 19 (6.9%) sont positifs au moins à 2 reprises
- 17 (6.1%) passent de séronégatif à séropositif
- 5 (1.8%) passent de séropositif à séronégatif
- 9 (3.3%) oscillent entre un statut douteux et négatif ou douteux et positif ou sont douteux à 2 reprises

Pour les 32 bovins ayant été testés 3 fois, les combinaisons de résultats sérologiques sont les suivantes :



Tableau 11 : résultats des sérologies pour les 32 bovins testés 3 fois

Combinaison	Effectif
NNN	19
NPN	1
NPP	4
DNN	1
PNN	1
PNP	2
PPN	1
PDP	1
PPP	2

*N = Négatif ; D = Douteux ; P = Positif*

Sur les 31 bovins ayant un résultat discordant entre au moins deux résultats sérologiques :

- 16 (51.6%) sont des bovins qui passent d'un résultat clairement séronégatif (densité optique valeur S/P très faible) à un résultat clairement séropositif (n=14) ou douteux (n=2)
- 4 passent d'un résultat négatif « fort » (valeur S/P proche du seuil de « douteux ») à un résultat clairement positif
- 8 passent d'un résultat positif (dont 5 positifs « faibles » avec une valeur S/P proche du seuil des « douteux ») à un résultat négatif « fort » ou douteux.
- De même, 2 bovins passent d'un résultat douteux, à un résultat négatif fort
- 1 bovin passe d'un résultat douteux à clairement négatif.

### III.3.2) Sérologie ELISA paratuberculose par statut vaccinal

Le tableau 12 présente les résultats de la première et de la deuxième sérologie ELISA pour les bovins vaccinés.

Tableau 12 : résultats des 2 premières sérologies chez les bovins vaccinés

<b>Bovins Vaccinés</b>		<b>Sérologie 2</b>				
		Négatif	Douteux	Positif	ND	Total
Sérologie 1	Négatif	53	2	<b>8</b>	98	161
	Douteux	2	1	0	7	10
	Positif	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>19</b>	<b>40</b>	<b>66</b>
	Total	60	5	<b>27</b>	145	237

\* ND = non déterminé

Sur l'ensemble des 237 bovins vaccinés testés au moins une fois en sérologie, 74 (31.2%) ont eu au moins un résultat positif en sérologie et 9 (3.8%) au moins un résultat douteux.

Sur les 92 bovins vaccinés et testés à au moins 2 reprises en sérologie :

- 53 (57.6%) sont séronégatifs à 2 dates
- 19 (20.6%) sont séropositifs à 2 dates
- 8 passent d'un résultat négatif à positif (n=8)
- 7 passent d'un résultat positif à un résultat négatif (n=5) ou douteux (n=2)
- 5 ont des résultats qui oscillent entre douteux et négatif
- 1 est douteux à 2 dates

Sur les 16 bovins vaccinés testés 3 fois, 7 ont des statuts concordants aux 3 dates, 5 sont constamment négatifs (NNN) et 2 sont constamment positifs (PPP). Pour les 9 autres bovins les résultats sont discordants pour au moins 2 dates : 4 sont PPN, 1 est PNN, 2 sont NPP, 1 est PNP et enfin 1 est PDP.

Les résultats de la première et de la deuxième sérologie ELISA pour les bovins non vaccinés sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : résultats des 2 premières sérologies chez les bovins non vaccinés

Bovins non vaccinés		Sérologie 2				
		Négatif	Douteux	Positif	ND	Total
Sérologie 1	Négatif	174	1	<b>9</b>	58	242
	Douteux	1	0	0	0	<b>1</b>
	Positif	0	0	0	<b>6</b>	<b>6</b>
	Total	175	1	<b>9</b>	64	249

\*ND = non déterminé

Sur les 249 bovins non vaccinés et testés au moins une fois, 15 (6.0 %) ont eu au moins un résultat positif en sérologie et 2 au moins un résultat douteux.

Sur les 185 bovins non vaccinés et testés au moins 2 fois en sérologie :

- Aucun n'est positif à deux reprises
- 174 (94.0%) sont négatifs à 2 reprises
- 10 (5.4%) passent d'un résultat négatif à un résultat positif (n=9) ou douteux (n=1)

Parmi les 16 bovins non vaccinés et testés à 3 reprises, 14 sont constamment séronégatifs, 1 est NND et un dernier est NNP.

Parmi les 13 bovins ayant des résultats discordants entre les différentes dates, 12 passent d'un résultat clairement négatif (valeur S/P faible) à un résultat clairement positif (n=10 valeur S/P très élevée) ou douteux (n=2). Un dernier animal passe d'un résultat douteux à négatif faible (valeur S/P faible).

### III.3.3) Sérologie ELISA paratuberculose par élevage et par statut vaccinal

Le tableau suivant présente la prévalence sérologique par troupeau et statut vaccinal. Une vache est considérée comme positive en sérologie dès lors qu'elle a obtenu au moins un résultat positif.

Tableau 14 : prévalence sérologique par troupeau et par statut vaccinal

Elevage	Bovins non vaccinés				Bovins vaccinés			
	NEG	DTX	POS	% POS ou DTX	NEG	DTX	POS	% POS ou DTX
ELEVAGE A	51	1	7	13.6	27	2	5	20.6
ELEVAGE B	49	0	1	2.0	6	1	6	53.8
ELEVAGE C	16	0	0	0.0	12	1	6	36.8
ELEVAGE D	20	0	0	0.0	42	1	8	17.6
ELEVAGE E	38	1	4	11.6	5	0	3	37.5
ELEVAGE F	17	0	3	15.0	1	1	11	92.3
ELEVAGE G	24	1	0	4.0	48	1	17	27.3
ELEVAGE H	15	0	1	6.3	10	5	18	69.7
Total	230	3	16	7.6	151	12	74	36.3

Sur les 486 bovins testés, 381 (78%) sont négatifs, 15 (3%) sont douteux et 90 (19%) sont positifs.

Sur les 249 bovins non vaccinés, 230 (92%) sont négatifs en sérologie, 3 sont douteux et 16 (6%) sont positifs. Ces 16 animaux sont répartis dans 5 élevages parmi les 8 étudiés. Le pourcentage d'animaux non vaccinés et positifs ou douteux est de 7.6%.

Concernant les 237 bovins vaccinés, 151 (64%) sont négatifs, 12 (5%) sont douteux et 74 (31%) sont positifs. Le pourcentage d'animaux vaccinés et positifs ou douteux est de 36.3%.

La proportion de bovins non vaccinés qui ont obtenu au moins un résultat positif ou douteux en sérologie variait de 0.0% à 15.0% selon les élevages. Les résultats de comparaisons 2 à 2 par des tests de Fisher n'indiquent aucune différence significative entre les élevages (avec ou sans correction de Benjamini et Yekutieli pour comparaisons multiples).

La proportion de bovins vaccinés qui ont obtenu au moins un résultat positif ou douteux en sérologie variait de 20.6% à 92.3% selon les élevages. Le tableau 15 présente les probabilités critiques (p-values) des résultats des comparaisons 2 à 2 entre élevages par test de Fisher pour le pourcentage de bovins ayant eu au moins un résultat positif ou douteux en sérologie, avec correction de Benjamini et Yekutieli pour comparaisons multiples.

Tableau 15 : probabilités critiques (p-values) des comparaisons 2 à 2 entre élevages pour le pourcentage de bovins ayant eu au moins un résultat positif ou douteux en sérologie.

	A	B	C	D	E	F	G
B	0.39936						
C	1	1					
D	1	0.17022	0.85703				
E	1	1	1	1			
F	0.00037	0.66933	0.044	0.00011	0.17022		
G	1	0.84137	1	1	1	0.00045	
H	0.00146	1	0.39936	0.00013	0.85703	0.96938	0.00146

L'élevage F avait une proportion significativement plus importante de bovins vaccinés séropositifs ou douteux (92.3%) que les élevages A (20.6%), C (36.8%), D (17.6%) et G (27.3%). De même l'élevage H avait des bovins vaccinés plus fréquemment séropositifs ou douteux (69.7%) que les élevages A, D et G.

Les autres comparaisons sont non significatives en raison d'un manque de puissance statistique (liée aux faibles effectifs) et à la correction pour comparaisons multiples.

Notons enfin que c'est dans l'élevage F que les proportions d'animaux séropositifs ou douteux sont les plus importantes, à la fois parmi les bovins vaccinés (92.3%) et non vaccinés (15.0%).

#### III.4) qPCR paratuberculose sur fèces : ensemble des échantillons

Sur l'ensemble des 792 échantillons de fèces analysés, 224 (28.3%) ont donné un résultat non négatif.

La distribution des valeurs de Ct (cycle de sortie de la PCR, inversement liée à la quantité d'ADN bactérien amplifié, et donc à la « charge » bactérienne présente dans l'échantillon testé) est présentée dans la figure suivante. La plupart des valeurs sont élevées, témoignant de faibles charges bactériennes dans la majorité des échantillons testés.

Seules 2 valeurs de Ct des échantillons bovins de la Meuse sont inférieures à la moyenne des valeurs de Ct des échantillons de l'ovine et du bovin témoins fortement excréteurs (OV 20065 – Ct moyen 20.50, BV 19-121 Ct moyen : 20.19).

Pour 28 échantillons bovins, les valeurs de Ct étaient inférieures à la moyenne des valeurs de Ct des échantillons de l'ovin témoin modérément à faiblement excréteur (OV 01046 – CT moyen 32.50).

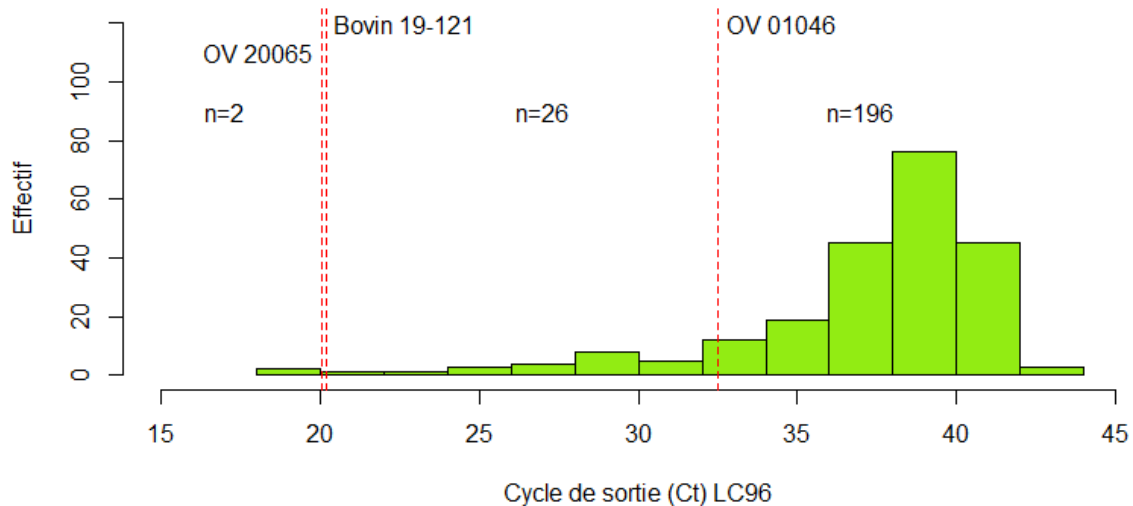


Figure 9 : Distribution des valeurs de Ct

Afin de grader la positivité des 224 échantillons non négatifs, les règles suivantes ont été utilisées, sur la base des résultats de qPCR d'une gamme de dilution en 7 points d'une solution quantifiée d'ADN purifié d'une souche K10 de MAP (Frank Biet, INRA ISP, Tours) :

Tableau 16 : grille d'interprétation du résultat en fonction de la valeur du Ct

Valeur CT	=< 25	]25-30]	]30-33.5]	]33.5-42]	>42.0
Charge bactérienne (équivalent bactéries / g de fèces)	> 10 000	1000 à 10 000	100 à 1000	1 à 1000	< 1
Classe	POS 4+	POS 3+	POS 2+	POS 1+	Négatif
Nombre d'échantillons	6	12	14	192	568
Nombre de bovins	6	11	12	142	315

### III.4.1) qPCR paratuberculose sur fèces : analyse à l'échelle des bovins

Au total, 171 bovins sur 486 (35.2%) ont eu au moins un résultat positif en qPCR.

Sur la base de la gradation précédente, les résultats croisés des analyses des échantillons de fèces lors des premières, deuxièmes et troisièmes analyses sont présentés dans les tableaux suivants. Pour les vaches avec 1, 2 ou 3 analyses :

Tableau 17 : résultats des 2 premières séries de qPCR

		qPCR 2					Total	
		NEG	POS 1+	POS 2+	POS 3+	POS 4+		ND
qPCR1	NEG	162	<b>27</b>	<b>3</b>	0	<b>1</b>	154	347
	POS 1+	<b>36</b>	<b>32</b>	<b>2</b>	0	0	<b>46</b>	116
	POS 2+	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	0	<b>5</b>	7
	POS 3+	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	<b>4</b>	11
	POS 4+	<b>1</b>	0	<b>1</b>	0	0	<b>3</b>	5
	Total	203	62	7	1	1	212	486

\* ND = non déterminé

La comparaison des résultats des 2 premières analyses indique que de nombreux bovins ont un statut variant de négatif à positif ou inversement. Ainsi :

- 41 vaches ayant un résultat positif à la première analyse ont un résultat négatif à la deuxième
- inversement 31 vaches négatives à la première analyse sont positives à la seconde.

Seules 40 vaches sur les 274 testées aux moins 2 fois (14.6%) sont positives aux 2 premières analyses. A l'inverse, 162 vaches (59.1%) sont négatives pour les 2 premières analyses. Les 32 vaches avec 3 analyses se répartissent de la manière suivante :

Tableau 18 : résultats pour les bovins ayant eu 3 qPCR sur fèces

Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3	Effectif
NEG	NEG	NEG	2
POS 1+	NEG	NEG	8
POS 1+	POS 1+	NEG	6
POS 2+	POS 1+	NEG	1
POS 3+	NEG	NEG	1
NEG	NEG	POS 1+	1
NEG	POS 1+	POS 1+	1
POS 1+	NEG	POS 1+	5
POS 1+	POS 1+	POS 1+	5
POS 3+	POS 3+	POS 1+	1
POS 4+	NEG	POS 1+	1

Le statut défini sur la base de la qPCR sur fèces s'avère peu stable pour ces vaches. Ainsi 23 vaches ont eu au moins 1 résultat POS1+ sur les 3 analyses, avec 1 ou 2 autre(s) résultat(s) négatif(s). Même certaines vaches ayant un résultat POS 3+ ou POS 4+ ont obtenu des résultats négatifs sur d'autres analyses.

Au total, 171 bovins sur 486 (35.2%) ont eu au moins 1 résultat positif en qPCR.

#### III.4.2) Niveaux d'excrétion par élevage

Le tableau suivant présente la répartition par élevage et par classe d'excrétion des 486 bovins suivis. Pour chaque bovin, le résultat d'analyse le plus défavorable (niveau d'excrétion maximal) parmi les 3 analyses possibles a été retenu.

Tableau 19 : distribution des bovins selon le niveau d'excrétion et l'élevage

	Niveau d'excrétion					Total
	NEG	POS 1+	POS 2+	POS 3+	POS 4+	
Elevage A	84	9	0	0	0	93
Elevage B	55	6	2	0	0	63
Elevage C	30	5	0	0	0	35
Elevage D	56	15	0	0	0	71
Elevage E	31	18	0	0	2	51
Elevage F	23	6	2	2	0	33
Elevage G	15	62	6	6	2	91
Elevage H	21	21	2	3	2	49
Total	315	142	12	11	6	486



Des animaux faiblement excréteurs sont identifiés dans tous les élevages suivis. Les 6 animaux très fortement excréteurs (POS 4+) se concentrent dans 3 élevages. Deux de ces élevages concentrent par ailleurs la majorité des bovins POS3+ et POS2+.

### III.4.3) qPCR paratuberculose sur fèces selon le statut vaccinal

Sur les 249 bovins non vaccinés, 70 (28.1%) ont eu au moins un résultat positif en qPCR. Sur les 237 bovins vaccinés, 101 (42.6%) ont eu au moins un résultat positif en qPCR.

La répartition des résultats de qPCR pour les 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> analyses chez les bovins non vaccinés et vaccinés est présentée dans les tableaux suivants.

Tableau 20 : résultats des 2 qPCR sur bovins non vaccinés

<b>Bovins non vaccinés</b>		<b>qPCR 2</b>						<b>Total</b>
		<b>NEG</b>	<b>POS 1+</b>	<b>POS 2+</b>	<b>POS 3+</b>	<b>POS 4+</b>	<b>ND</b>	
<b>qPCR1</b>	<b>NEG</b>	126	<b>8</b>	<b>2</b>	0	<b>1</b>	53	190
	<b>POS 1+</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	0	0	<b>9</b>	50
	<b>POS 2+</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	0	<b>2</b>	4
	<b>POS 3+</b>	0	0	0	0	0	<b>1</b>	1
	<b>POS 4+</b>	<b>1</b>	0	<b>1</b>	0	0	<b>2</b>	4
	<b>Total</b>	153	24	4	0	1	67	249

Tableau 21 : résultats des 2 qPCR sur bovins vaccinés

Bovins vaccinés		qPCR 2						Total
		NEG	POS 1+	POS 2+	POS 3+	POS 4+	ND	
qPCR1	NEG	36	<b>19</b>	<b>1</b>	0	<b>0</b>	101	157
	POS 1+	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	0	0	<b>37</b>	66
	POS 2+	<b>0</b>	<b>0</b>	0	0	0	<b>3</b>	3
	POS 3+	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	0	<b>3</b>	10
	POS 4+	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	0	<b>1</b>	1
	Total	50	38	3	1	0	145	237

Les 32 vaches avec 3 analyses se répartissent de la manière suivante :

Tableau 22 : résultats pour les bovins ayant eu 3 qPCR sur fèces en fonction du statut vaccinal

Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3	Effectif non vacciné	Effectif vacciné	Total
NEG	NEG	NEG	0	2	2
POS 1+	NEG	NEG	7	1	8
POS 1+	POS 1+	NEG	4	2	6
POS 2+	POS 1+	NEG	1		1
POS 3+	NEG	NEG		1	1
NEG	NEG	POS 1+		1	1
NEG	POS 1+	POS 1+		1	1
POS 1+	NEG	POS 1+	1	4	5
POS 1+	POS 1+	POS 1+	2	3	5
POS 3+	POS 3+	POS 1+		1	1
POS 4+	NEG	POS 1+	1		1

#### III.4.4) qPCR paratuberculose sur fèces selon l'élevage et le statut vaccinal

Les effectifs et proportions des animaux positifs au moins une fois en qPCR sur fèces, en fonction de leur statut vaccinal, sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 23 : effectifs d'animaux positifs par élevage en fonction du statut vaccinal

	Bovin non vaccinés		Bovins vaccinés	
	Effectif positif /testé	% positif	Effectif positif /testé	% positif
ELEVAGE A	9/59	15.3	0/34	0.0
ELEVAGE B	7/50	14.0	1/13	7.7
ELEVAGE C	1/16	6.3	4/19	21.1
ELEVAGE D	1/20	5.0	14/51	27.5
ELEVAGE E	19/43	44.2	1/8	12.5
ELEVAGE F	6/20	30.0	4/13	30.8
ELEVAGE G	20/25	80.0	56/66	84.8
ELEVAGE H	7/16	43.8	21/33	63.6
Total	70/249	28.11	101/237	42.6

De même que précédemment, les proportions de bovins positifs en qPCR sur fèces ont été comparées entre élevages par des tests de Fisher avec correction de Benjamini et Yekutieli. Les résultats sont présentés dans le tableau 24 pour les bovins non vaccinés et 25 pour les bovins vaccinés.

Tableau 24 : probabilités critiques (p-values) des comparaisons 2 à 2 entre élevages pour le pourcentage de bovins non vaccinés ayant eu au moins un résultat positif en qPCR sur fèces.

	A	B	C	D	E	F	G
B	1						
C	1	1					
D	1	1	1				
E	0.026	0.031	0.065	0.026			
F	1	1	0.674	0.629	1		
G	<10 <sup>-5</sup>	<10 <sup>-5</sup>	<10 <sup>-4</sup>	<10 <sup>-4</sup>	0.063	0.022	
H	0.263	0.253	0.273	0.121	1	1	0.210

Pour les bovins non vaccinés, l'élevage G avait une prévalence de bovins excréteurs de 80% (20/25), significativement supérieure à tous les autres élevages, excepté l'élevage E (p=0.063). De même la prévalence de bovins excréteurs dans l'élevage E (44.2%, 19/43), était significativement supérieure à celle observée dans les élevages A, B, et D.

Les autres comparaisons sont non significatives en raison d'un manque de puissance statistique (liée aux faibles effectifs) et à la correction pour comparaisons multiples.

Tableau 25 : probabilités critiques (p-values) des comparaisons 2 à 2 entre élevages pour le pourcentage de bovins vaccinés ayant eu au moins un résultat positif en qPCR sur fèces.

	A	B	C	D	E	F	G
B	1						
C	0.1120	1					
D	0.0074	1	1				
E	1	1	1	1			
F	0.0380	1	1	1	1		
G	$< 10^{-16}$	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	$< 10^{-8}$	0.0014	0.0029	
H	$< 10^{-7}$	0.0094	0.0380	0.0161	0.1236	0.3845	0.16119

La proportion de bovins vaccinés positifs au moins une fois en qPCR sur fèces était significativement supérieure dans les élevages G (84.6%) et H (63.6%) que dans la majorité des autres élevages. A l'inverse cette proportion était nulle dans l'élevage A et significativement inférieure à celle observée dans tous les autres élevages à l'exception de l'élevage B (7.7%), C (21.1%) et E (12.5%).

Les autres comparaisons sont non significatives en raison d'un manque de puissance statistique (liée aux faibles effectifs) et à la correction pour comparaisons multiples.

Pour 3 élevages (B, E et F), les effectifs de bovins vaccinés et testés étaient trop faibles (<15) pour pouvoir en tirer des conclusions sur la relation entre le statut vaccinal et l'excrétion fécale de *Map*.

Pour les 5 autres élevages, les prévalences de bovins positifs au moins une fois en qPCR parmi les bovins vaccinés et non vaccinés étaient :

- non statistiquement différentes pour l'élevage H, (p=0.228), l'élevage C (p=0.35) et l'élevage G (p=0.54) ;
- proche du seuil de significativité pour l'élevage D (p=0.0515), en faveur d'une plus faible prévalence parmi les bovins non vaccinés.
- significativement différente pour l'élevage A (p=0.0238), avec une prévalence plus faible parmi les bovins vaccinés.

Un modèle logistique à effet aléatoire vache et élevage a été ajusté aux données afin d'avoir une évaluation plus robuste et globale de l'effet de la vaccination sur le statut excréteur (OUI/NON) des animaux. Les autres variables explicatives prises en compte étaient

l'âge au moment du prélèvement (en variable continue, ou par classe de 1 an), le statut sérologique des vaches et les interactions entre la vaccination x âge et vaccination x statut sérologique.

Selon les résultats de ce modèle, l'âge des bovins testés n'avait pas d'influence significative sur le statut excréteur positif ou négatif ( $p=0.66$ ). En revanche le terme aléatoire attaché aux élevages était très significatif, traduisant un effet élevage très fort sur la probabilité d'excrétion, déjà mentionné précédemment.

Les effets de la vaccination sur le statut positif ou négatif du résultat de qPCR sur fèces variaient selon le statut sérologique. Ainsi, comparativement aux bovins non vaccinés séronégatifs, pris comme référence :

- Les bovins non vaccinés séropositifs étaient plus fréquemment positifs en qPCR sur fèces (OR = 3.41, intervalle de confiance à 95% IC95% : 1.12 – 9.85,  $p=0.0249$ ).
- Les bovins vaccinés séronégatifs avaient tendance à être plus fréquemment positifs en qPCR (OR=1.45, IC95% = 0.92 – 2.28), mais cette différence n'était pas significative ( $p=0.108$ )
- La fréquence des résultats positifs en qPCR chez les bovins vaccinés séropositifs n'était pas significativement différente ( $p=0.282$ )

Les autres comparaisons indiquent que les bovins vaccinés séropositifs avaient tendance à être moins fréquemment positifs en qPCR sur fèces que les bovins non vaccinés séropositifs (OR = 0.39, IC95% = 0.12 – 1.23), mais cette différence n'était pas significative ( $p=0.11$ )

Le détail de ces comparaisons deux à deux est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 26 : comparaison des résultats de qPCR en fonction des différents groupes étudiés

Groupe 1	Comparé au Groupe	OR	IC 95%	p value
Non vacciné séropositif	Non vacciné séronégatif	3.41	1.12 – 9.85	0.0249
Vacciné séronégatif		1.45	0.92 – 2.28	0.108
Vacciné séropositif		1.34	0.79 – 2.27	0.282
Non vacciné séropositif	Vacciné séronégatif	2.35	0.77 – 7.22	0.134
Vacciné séropositif	Vacciné séronégatif	0.92	0.53 – 1.60	0.772
	Non vacciné séropositif	0.39	0.12 – 1.23	0.11

### III.4.5) Niveau d'excrétion selon le statut vaccinal

Le tableau suivant présente les niveaux d'excrétion en classe en fonction du statut vaccinal.

Tableau 27 : effectifs de bovins excréteurs par niveau d'excrétion et par statut vaccinal

Niveau d'excrétion	Bovin non vaccinés			Bovins vaccinés		
	Effectif	%	% parmi les non négatifs	Effectif	%	% parmi les non négatifs
POS 4+	5	2.0	7.2	1	0.4	1.0
POS 3+	1	0.4	1.4	10	4.2	9.9
POS 2+	7	2.8	10.0	5	2.1	4.9
POS 1+	57	22.9	81.4	85	35.9	84.1
NEG	179	71.9	-	136	57.4	-
Total	249	100.0	100.0	237	100.0	100.0

La comparaison des effectifs par un test exact de Fisher révèle une différence significative de distribution des niveaux entre les bovins vaccinés et non vaccinés ( $p=10^{-4}$ ). Ainsi, parmi les bovins excréteurs non vaccinés ( $n=70$ ) et vaccinés ( $n=101$ ), la proportion de ceux classés POS3+ était significativement plus importante parmi les bovins vaccinés (9.9%) que parmi les bovins non vaccinés (1.4%), ( $p=0.03$ ). A l'inverse la proportion de bovins excréteurs notés POS4+ était significativement plus élevée parmi les bovins non vaccinés (7.2%) que parmi les bovins vaccinés (0.4%), ( $p=0.04$ ). En regroupant ces deux classes, les différences entre les bovins vaccinés et non vaccinés ne sont plus significatives ( $p=0.4$ ).

Dans une seconde analyse, la comparaison entre les niveaux d'excrétion des 171 bovins positifs en qPCR sur fèces (soit 224 échantillons) s'est faite sur la base des valeurs de Ct, transformées en équivalents bactéries par gramme de fèces à partir des données de la gamme de dilution de la souche K10. Comme précédemment, la prise en compte du statut sérologique permet d'avoir une analyse plus fine.

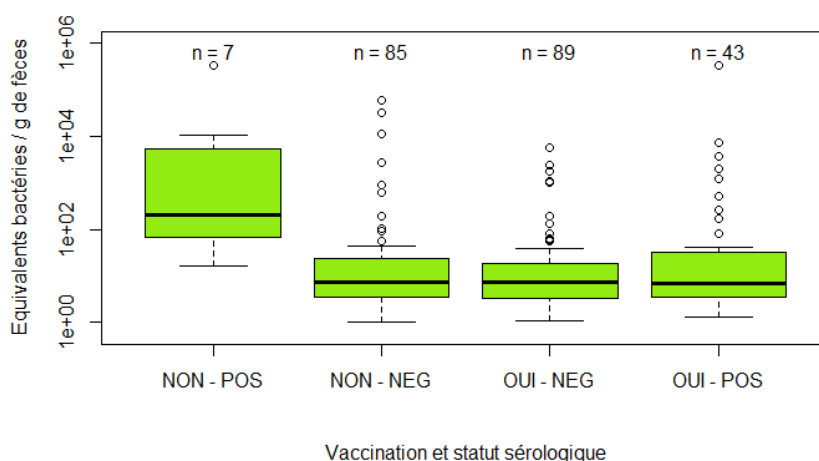


Figure 10 : distribution des valeurs de Ct des qPCR sur fèces selon le statut vaccinal et le statut sérologique des bovins (n=224 échantillons positifs en qPCR)

Les données descriptives, et en équivalent bactéries par gramme de fèces, sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 28 : répartition des résultats de qPCR en équivalent bactéries par gramme de fèces

Vaccination	Statut sérologique	Effectif	Charge bactérienne (en équivalent bactéries par gramme de fèces)				
			1 <sup>er</sup> quartile	Médiane	Moyenne	3 <sup>e</sup> quartile	Maximum
Non	Positif	7	67	209	50240	5400	340500
Non	Négatif	85	3	8	1280	23	59000
Oui	Négatif	89	3	8	188	19	5600
Oui	Positif	43	3	7	8200	35	337000

La comparaison des niveaux d'excrétion fécale de *Map* entre les 4 groupes (tests deux à deux de Mann Whitney Wilcoxon, avec correction de Holm pour comparaisons multiples) montre que :

- les bovins non vaccinés séropositifs sont ceux qui ont un niveau d'excrétion fécale significativement plus élevé que les autres groupes de bovins (toutes p value < 0.01).
- il n'y a pas de différence significative entre les bovins vaccinés séropositifs, séronégatifs et non vaccinés séronégatifs.

La modélisation du niveau d'excrétion fécale par un modèle linéaire à effet aléatoire élevage, prenant en compte l'âge des bovins lors de la réalisation des prélèvements ainsi que

leur statut sérologique et les interactions vaccination x âge et vaccination x statut sérologique conduit aux mêmes conclusions.

Ce constat est cependant à prendre avec précaution compte tenu du faible effectif du groupe « non vacciné séropositif » (n=7).

### III.5) Effet de l'âge à la vaccination

Les objectifs étaient de voir dans quelles mesures l'âge à la vaccination avait un effet d'une part sur le statut sérologique des animaux et d'autre part sur le résultat de la qPCR sur fèces. Les analyses ont été réalisées sur les seuls bovins vaccinés (n=237).

#### III.5.1) Effet de l'âge à la vaccination sur le statut sérologique à la première analyse

Le tableau ci-dessous décrit la répartition des résultats sérologiques lors de la première analyse en fonction de l'âge à la vaccination paratuberculose.

Tableau 29 : répartition des résultats de la première sérologie en fonction de l'âge à la vaccination

Résultat Sérologie	Age à la vaccination (en mois)				Total
	[0-3]	]3-6]	]6-9]	> 9	
Négatif	38	62	35	26	161
Douteux	2	1	2	5	10
Positif	8	15	29	14	66
Total	48	78	66	45	237
<i>% positif ou douteux</i>	<i>20.8</i>	<i>20.5</i>	<i>47.0</i>	<i>42.2</i>	

La proportion d'animaux séropositifs ou douteux apparaît significativement plus importante parmi les animaux vaccinés au-delà de 6 mois ( $p < 10^{-3}$ ).

La modélisation du statut sérologique par un modèle logistique à effet aléatoire élevage, prenant en compte l'âge des bovins lors de la première analyse sérologique et leur résultat en qPCR sur fèces indique :



- une absence d'effet de l'âge à la date de prélèvement sur le statut sérologique
- une absence d'effet du résultat de la qPCR sur fèces sur le statut sérologique
- une influence très significative ( $p < 10^{-3}$ ) de l'âge à la vaccination sur la probabilité d'être séropositif. Ainsi, en comparaison des bovins vaccinés entre 6 et 9 mois, ceux vaccinés plus jeunes étaient significativement moins fréquemment séropositifs (vaccinés avant 3 mois, OR = 0.234 IC95% = 0.08 – 0.60,  $p=0.002$  ; vaccinés entre 3 et 6 mois : OR = 0.249 IC95% = 0.11 – 0.55,  $p < 10^{-3}$ ). D'après ce modèle, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes d'âge « 6-9 mois » et « > 9 mois », ni entre les deux classes d'âge les plus jeunes.

Ces résultats sont concordants que l'on considère les résultats « douteux » en sérologie comme « positifs » ou « négatifs ».

### III.5.2) Effet de l'âge à la vaccination sur le statut excréteur

Le tableau ci-dessous décrit la répartition des résultats de qPCR sur fèces lors de la première analyse en fonction de l'âge à la vaccination contre la paratuberculose.

Tableau 30 : répartition des résultats de la première qPCR en fonction de l'âge à la vaccination

Résultat qPCR	Age à la vaccination (en mois)				Total
	[0-3]	]3-6]	]6-9]	> 9	
Négatif	32	48	44	33	157
Positif	16	30	22	12	80
Total	48	78	66	45	237
% positif	33.3	38.5	33.3	26.7	

La proportion de bovins vaccinés excréteurs lors de la première analyse ne diffère pas entre les différentes classes d'âge à la vaccination (test  $\chi^2$ ,  $p=0.6165$ ). La modélisation par un modèle logistique à effet aléatoire élevage, prenant en compte l'âge et le statut sérologique lors du prélèvement et l'interaction entre l'âge à la vaccination et le statut sérologique, conduit à la même conclusion.

Si l'on prend en compte l'ensemble des 345 résultats de qPCR sur fèces, c'est-à-dire en incluant aussi les 2<sup>e</sup> analyses pour 92 bovins et les 3<sup>e</sup> pour 16 bovins, le tableau suivant est généré :

Tableau 31 : répartition des résultats de toutes les qPCR en fonction de l'âge à la vaccination

Résultat qPCR	Age à la vaccination (en mois)				Total
	[0-3]	]3-6]	]6-9]	> 9	
Négatif	35	59	69	50	213
Positif	23	47	43	19	132
Total	58	47	112	69	345
<i>% positif</i>	<i>39.6</i>	<i>44.3</i>	<i>38.4</i>	<i>27.5</i>	

De même que précédemment, la proportion de résultats positifs en qPCR ne différait pas entre les différentes classes d'âges à la vaccination (test  $\chi^2$ ,  $p=0.167$ ).

Une analyse par modèle logistique multivarié à effet aléatoire élevage et bovin conduit à la même conclusion d'absence d'effet de l'âge à la vaccination sur le statut excréteur.

### III.5.3) Effet de l'âge à la vaccination sur le niveau d'excrétion.

Les analyses sont conduites sur les seules vaches vaccinées et positives en qPCR sur fèces ( $n=101$ ).

L'ensemble des échantillons positifs a été inclus dans l'analyse ( $n=132$ ), certaines vaches ayant plusieurs échantillons positifs.

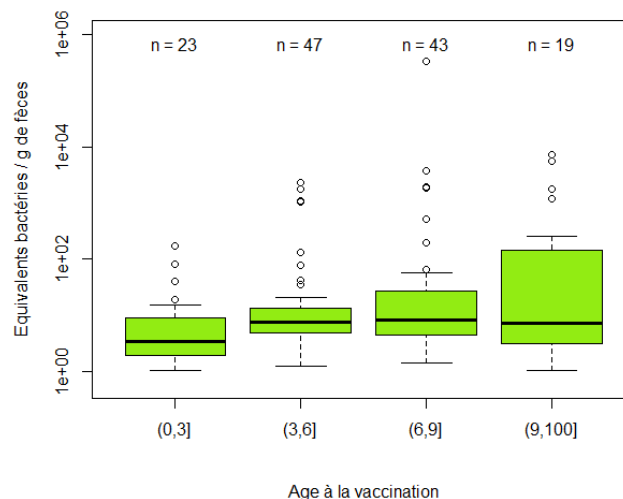


Figure 11 : distribution des échantillons positifs en fonction de l'âge à la vaccination et du niveau d'excrétion

Il semble que les bovins vaccinés avant 3 mois d'âge ont des niveaux d'excrétion plus faibles que les autres. Cependant, la comparaison des niveaux d'excrétion fécale de *Map* entre les 4 groupes (tests deux à deux de Mann Whitney Wilcoxon, avec correction de Benjamini et Yekutieli pour comparaisons multiples) montre l'absence de différence significative.

La modélisation du niveau d'excrétion fécale par un modèle linéaire à effet aléatoire bovin et élevage, prenant en compte l'âge des bovins ainsi que leur statut sérologique lors de la réalisation des prélèvements conduit aux mêmes conclusions.

Ainsi le niveau d'excrétion des bovins vaccinés excréteurs ne semble pas dépendre de l'âge à la vaccination.

## IV) DISCUSSION

### IV.1) Population et schéma d'étude

Le nombre total d'animaux prélevés semble satisfaisant pour l'interprétation des résultats. En effet, avec une hypothèse initiale de fréquence d'excrétion fécale de *Map* chez les bovins non vaccinés de 30%, la mise en évidence d'une réduction par 2 chez les bovins vaccinés (15%) nécessiterait 160 bovins par groupe (pour un risque alpha de 5% et un risque bêta de 10%, soit une puissance de 90%). L'inclusion de 249 bovins non vaccinés et de 237 bovins vaccinés était associée à une puissance de 98% pour la mise en évidence d'une réduction de moitié de la fréquence de l'excrétion fécale. A posteriori, l'hypothèse initiale relative à la fréquence d'excrétion fécale chez les bovins non vaccinés s'est révélée vérifiée (fréquence observée 28.11%) et les effectifs permettaient de mettre en évidence une réduction d'un tiers de la fréquence d'excrétion fécale (28.11 à 17.4%).

Cependant notre étude souffre de plusieurs limites inhérentes à la population d'étude et aux méthodes de suivi qui peuvent réduire la robustesse des conclusions apportées. En premier lieu, au sein de chaque élevage, les conditions d'exposition à *Map*, principalement dans le jeune âge, pourraient être différentes entre les bovins non vaccinés et vaccinés. Les conditions de vie, de la naissance au prélèvement, sont différentes. S'il s'avérait que la vaccination réduisait la fréquence et/ou le niveau d'excrétion fécale de *Map*, il serait légitime de suspecter une pression d'infection à la naissance augmentée pour la première génération d'animaux vaccinés en comparaison aux générations suivantes. Dans ces conditions, l'exposition à *Map* des bovins vaccinés serait moindre que celle des bovins non vaccinés, et pourrait là aussi conduire à une surestimation de l'effet de la vaccination. Les vaches prélevées dans les troupeaux inclus dans notre étude correspondent à la première génération de vaches vaccinées et à la dernière génération de vaches non vaccinées, limitant donc cette réduction d'exposition entre deux cohortes. Par ailleurs, au sein de chaque troupeau les conditions d'élevage entre bovins vaccinés et non vaccinés étaient les mêmes et les prélèvements des groupes contrôles et des animaux vaccinés ont été réalisés de manière systématisée et aux mêmes dates. Ce schéma d'étude possède l'avantage d'avoir des conditions d'expositions et d'élevage quasiment identiques pour chaque animal au contraire d'une étude longitudinale d'efficacité vaccinale comparant le statut d'animaux avant la mise en place de la vaccination (temps T0) à ceux de bovins nés après la mise en place de la

vaccination (temps T1). Il permet aussi de s'affranchir de l'effet troupeau puisque les animaux vaccinés et non vaccinés sont présents et donc prélevés au sein d'un même élevage. Le facteur élevage présent dans le cas où un groupe d'élevages non vaccinés servirait de référence par rapport à un deuxième groupe d'élevages vaccinés est ainsi supprimé.

Par ailleurs, l'âge des vaches lors de la réalisation des prélèvements était, en médiane, plus élevé de 8 mois pour les vaches non vaccinées que pour les vaches vaccinées. Les vaches plus âgées infectées par *Map* auraient tendance à excréter *Map* à des taux et des fréquences plus importants que les animaux plus jeunes (Mitchell et al., 2015). Ceci s'explique grâce à la cinétique d'excrétion de la paratuberculose qui, bien qu'elle soit toujours intermittente, augmente dans le temps. De même, si la vaccination avait pour effet de retarder l'excrétion fécale de *Map*, une prévalence plus faible pourrait être attendue chez les bovins vaccinés d'autant plus qu'ils étaient plus jeunes lors de l'évaluation de leur statut excréteur. Ainsi cette différence d'âge entre les groupes vaccinés et non vaccinés pourrait biaiser les comparaisons réalisées entre bovins vaccinés et non vaccinés, dans le sens d'une surestimation de l'effet favorable de la vaccination sur l'excrétion fécale de *Map*. Cependant, l'âge lors du prélèvement n'avait pas d'effet significatif ni sur la probabilité ni sur l'intensité de l'excrétion dans l'ensemble des modèles multivariés ajustés aux données, ce qui semble montrer que sur la durée de l'étude (1 an), ces différences d'âge n'avaient pas d'influence.

Les élevages sélectionnés dans le cadre de cette étude sont tous inscrits depuis plusieurs années dans un programme d'éradication/assainissement de la paratuberculose. Ce plan consiste à appliquer, en plus de la vaccination contre *Map*, de nombreuses mesures de biosécurité et le dépistage et l'élimination des vaches séropositives. Ainsi, le nombre d'animaux en phase clinique fortement excréteurs au sein des différents élevages et donc la pression d'infection pourraient avoir diminué grâce à ces mesures de prophylaxie sanitaire. Il est donc impossible de s'affranchir de l'effet des autres mesures du plan de lutte dans l'analyse des résultats, et notre étude ne permet pas d'évaluer strictement l'effet de la vaccination sur la réduction de l'infection au sein des troupeaux. Il semble plus judicieux de considérer que notre étude a tenté d'évaluer, dans son ensemble, l'efficacité du plan d'assainissement de la paratuberculose incluant la vaccination. Dans le cas d'une prévalence globale faible à très faible de l'infection au sein des troupeaux investigués, y compris chez les bovins non vaccinés, la mise en évidence d'un effet favorable de la vaccination devient plus difficile car elle requiert des effectifs très importants. Il apparaît cependant que pour la majorité des

élevages, l'incidence sérologique annuelle n'avait pas évolué de manière significative dans les deux à trois campagnes précédant notre étude, indiquant que cette réduction des conditions d'exposition à *Map* devait être réduite au sein des élevages investigués.

Lors de l'étude des effectifs prélevés selon le statut vaccinal, il ressort que seulement 32 % des vaches vaccinées ont été prélevées deux fois contre 69 % des vaches non vaccinées. En raison de la cinétique d'excrétion de la paratuberculose et de l'absence de prélèvements répétés, le risque de sous-évaluation de la prévalence d'excrétion fécale de *Map* chez les animaux vaccinés est plus important que pour les animaux non vaccinés. Cette différence aurait pour effet de surestimer l'effet favorable de la vaccination sur l'excrétion fécale de *Map*.

Enfin, de manière générale, les tests diagnostiques disponibles pour la paratuberculose sont imparfaits (Whittington et al., 2019). La sensibilité du kit ELISA (ID Screen® Paratuberculosis Indirect, ID.Vet, Montpellier, France) utilisé dans l'étude est estimée à 37.7% avec un intervalle de confiance compris entre 24.7% et 52.1% (Fry et al., 2008). De plus, l'interaction potentielle du vaccin avec le kit de diagnostic est mal connue. Du fait de l'incertitude induite par ces deux facteurs il existe un biais potentiel de classement du statut infectieux de l'animal.

Parmi les vaches prélevées dans cette étude, une grande proportion sont au rang 2 de lactation, c'est-à-dire qu'elles ont en moyenne 48 mois. En raison de la longue durée d'incubation de la paratuberculose, l'excrétion de *Map* dans les fèces et le taux d'anticorps sériques sont très variables et inconstants chez les animaux infectés dans les premières années de vie. La probabilité de ne pas détecter des animaux infectés ou infectieux est donc plus grande. Cependant, il ne semblait pas judicieux de cibler des animaux plus âgés, car une réforme différentielle liée à la paratuberculose, consciente (sur la base de résultat de sérologies positives pour les bovins non vaccinés par exemple) ou inconsciente (réduction des performances liées à une infection subclinique par exemple) pourrait avoir conduit à un échantillon non représentatif de vaches (vaches moins fréquemment infectées). Par ailleurs, la proportion de vaches en 3<sup>e</sup> lactation et plus est beaucoup moins importante en raison de taux de renouvellement élevés (taux moyens de 30%, 2.5 lactations en moyenne par vache).

Pour pallier aux différentes difficultés listées ci-dessus, une première solution serait de prélever une seconde fois un maximum d'animaux n'ayant pour le moment qu'une seule évaluation de leur statut sanitaire, principalement parmi les bovins vaccinés. Les proportions

d'animaux prélevés deux fois au sein de chaque groupe seraient alors rééquilibrées. L'augmentation du nombre de prélèvements par animal permettra par ailleurs de réduire le biais de classement dû à la sensibilité moyenne des tests diagnostiques et d'augmenter la puissance statistique de l'étude. Une deuxième solution consisterait à augmenter le nombre global d'animaux prélevés. Dans ce cas, l'impact de la définition incertaine des statuts infectieux serait réduit. La solution retenue à ce jour associe les deux approches, en prévoyant une nouvelle série de prélèvements en décembre 2019, visant à re-tester des vaches prélevées une seule fois et à inclure de nouveaux bovins vaccinés dans les élevages pour lesquels ils sont peu nombreux à l'heure actuelle (élevages ayant mis en place la vaccination en 2016-2017).

## IV.2) Résultats

### IV.2.1) Réponses sérologiques

Parmi les bovins non vaccinés la séroprévalence globale était de 6.4% (7.6% en incluant les bovins avec un résultat douteux) et variait de 0 à 15% selon les élevages. La séroprévalence parmi les animaux non vaccinés peut apparaître comme relativement faible pour des élevages infectés par *Map* mais s'apparente à celle observée dans d'autres études portant sur l'intérêt de la vaccination chez les ovins ou bovins (Reddacliff et al., 2006 ; Tewari et al., 2014). La faible sensibilité diagnostique de la sérologie ELISA limite par ailleurs la détection des animaux réellement infectés. La forte diversité de valeur de séroprévalence entre élevages dans notre étude doit être interprétée avec précaution en raison des faibles effectifs de bovins testés dans certains d'entre eux.

Notons par ailleurs que parmi les 174 bovins non vaccinés et séronégatifs lors de leur première analyse, 10 séropositifs (9 lors de la deuxième analyse, et 1 lors de la troisième) et 2 passent de négatifs à douteux sur la période de suivi d'avril 2018 à avril 2019, soit une incidence globale de séroconversion sur un an de 6.9%. Cette incidence sérologique est comparable à la médiane des valeurs observées les années précédentes dans les troupeaux suivis (6.8%). Ces séroconversions concernent uniquement quatre élevages : l'élevage A (n=7, incidence intra-élevage  $7/46 = 15.2\%$ ), le E (n=3, incidence intra-élevage  $3/37 = 8.1\%$ ), le F et le H (n=1 pour les 2, soit une incidence intra-élevage respective de  $1/18 = 5.6\%$  et

1/24=4.2%). Ces valeurs d'incidence sont aussi comparables à celles observées durant les campagnes de prophylaxie précédentes (2014-2016).

Pour les 2 élevages dans lesquels aucun animal n'a été détecté positif en sérologie dans notre étude (élevages C et D) les résultats des campagnes de prophylaxie 2015 et 2016 attestent d'une incidence sérologique annuelle comprise entre 2.4% et 7.3%. Le faible nombre de bovins en deuxième lactation et non vaccinés de ces troupeaux inclus dans l'étude (respectivement 16 et 20) est compatibles avec l'absence de séropositivité observée pour des incidence annuelles faibles.

Pour les bovins vaccinés de notre étude, la séroprévalence était de 31% (36.3% en incluant les résultats douteux) et était variable selon les élevages (entre 17.6 et 92.3%). La séroprévalence globale observée est plus faible que celle rapportée dans une étude portant sur la vaccination au Mycopar® de veaux avant l'âge de 35 jours (Tewari et al., 2014). Dans cette étude menée dans 2 troupeaux fortement infectés les séroprévalences parmi les bovins vaccinés était de 83.3% et 73.7% deux ans après leur vaccination et de 51.0% dans les deux troupeaux après 7 ans. Ces résultats montrent que la vaccination n'engendre pas une séroconversion systématique et que la réponse humorale tend à décroître avec l'âge. La durée de suivi des animaux vaccinés dans notre étude est trop courte (1 an) pour pouvoir mettre en évidence cette décroissance, comme le montre l'absence d'influence significative de l'âge lors du prélèvement sur le statut sérologique des animaux vaccinés dans notre analyse multivariée.

La variabilité de la réponse sérologique post-vaccinale est mal comprise et encore aujourd'hui les interactions du vaccin Silirum® avec le système immunitaire sont très mal connues. Une étude sur le modèle ovin a été menée à l'UMR INRA-ENVT 1225 IHAP visant à évaluer les conséquences d'une vaccination au Gudair® chez 690 agnelles de renouvellement âgées de 4 à 6 mois dans 5 élevages ovins allaitants du Lot (Lafort 2015; Mathevon et al. 2015). Les résultats indiquent que la séroprévalence était comprise entre 92% et 100%, soit bien au-delà des résultats observés dans notre étude. De plus dans l'étude ovine, la séroprévalence était identique quel que soit l'âge des animaux prélevés, entre 1 et 4 ans après l'injection vaccinale. Lorsque la vaccination est réalisée de manière plus précoce (entre 1 et 3 mois) la proportion d'animaux séropositifs semble plus hétérogène (entre 50% et 85% à 1 an d'âge) et décroît fortement avec l'âge (moins de 20% à 48 mois post vaccination) (Reddacliff et al., 2006).



Dans notre étude, nous avons mis en évidence que la séroprévalence chez les vaches vaccinées au jeune âge (moins de 6 mois) était significativement plus faible que parmi les vaches vaccinées après 6 mois. Pour expliquer ces résultats, deux hypothèses indissociables peuvent être mobilisées, selon que l'on considère que la réaction immunitaire humorale mise en évidence est liée à la vaccination ou liée à l'infection naturelle. Soit la vaccination précoce a permis une protection suffisante pour limiter la séroconversion naturelle liée à l'infection par *Map*, contrairement à une vaccination plus tardive ; soit la vaccination précoce a été associée à une réaction immunitaire humorale moindre (indépendamment du niveau de protection vis-à-vis de l'infection naturelle). Il est aussi possible que les deux phénomènes agissent de manière conjointe. En l'absence de test sérologique permettant de distinguer les animaux vaccinés des animaux naturellement infectés (sérologie DIVA) il est impossible de trancher en dehors d'un contexte expérimental visant à évaluer les effets de l'âge à la vaccination sur la réponse humorale.

De manière étonnante, certains bovins vaccinés ont obtenu des résultats discordants en sérologie ELISA entre les différentes dates où ils ont été testés. Les séroconversions observées chez les 8 animaux sont plus probablement imputables à une infection naturelle qu'à la vaccination, compte tenu du délai très long entre la vaccination et la date des tests sérologiques. Les âges à la vaccination de ces 8 bovins étaient compris entre 3.6 mois et 15.2 mois (médiane 7.3 mois), non significativement différents des autres bovins vaccinés. On observe également quelques animaux (n=9) passer du statut sérologique positif à négatif ou douteux et des animaux osciller autour du statut douteux/négatif. Ces résultats peuvent s'expliquer par une variation de la réponse humorale en fonction du stade de lactation de la vache (Nielsen, Toft, 2012). Cette information n'était malheureusement pas disponible au moment de l'analyse des données de notre étude. De plus, comme déjà démontré, la persistance de la séropositivité post-vaccination est variable et décroît avec l'âge (Thomsen et al., 2012). Etant donné que la série de prélèvements s'étale sur un peu plus d'un an, on peut supposer que certaines vaches ne sont plus détectées comme positives à la sérologie lors de leur dernière analyse. Enfin, un défaut de traçabilité des échantillons ne peut être totalement exclu malgré toutes les mesures mises en œuvre pour limiter ce risque.

#### IV.2.2) Statut excréteur fécal

Les taux de positivité en qPCR varient entre 9.7 et 83.5% selon les élevages. Ici encore les comparaisons entre élevages doivent être interprétées avec prudence compte tenu des effectifs parfois faibles. La part des bovins positifs en qPCR sur fèces avec un niveau d'excrétion évalué à 1+ est très majoritaire dans tous les élevages. Cette part représente 60% à 100% (dans 3 élevages) des animaux positifs en qPCR selon les élevages. Il faut interpréter ces résultats avec prudence et ne pas forcément considérer un animal excréteur au niveau 1+ comme infecté et excréteur. Il existe un phénomène d'excrétion passive (Kralik et al., 2014). Un animal peut ingérer des bacilles paratuberculeux et les éliminer dans ses bouses sans contracter la maladie et participer à la multiplication du bacille. *Map* ne fait dans ce cas-là que transiter dans le tube digestif de l'hôte sans induire d'infection. Il est fort probable qu'un certain nombre d'animaux détectés positifs 1+ soient des excréteurs passifs à cause de la présence et de la persistance de *Map* dans l'environnement. La qPCR étant extrêmement sensible, elle permet de détecter l'excrétion passive. Il n'est cependant pas possible de différencier ce transport passif d'une excrétion de faible niveau chez des animaux réellement infectés et excréteurs. Afin de les différencier, il faudrait répéter les prélèvements dans le temps afin de voir si ces animaux faiblement excréteurs sont positifs de manière répétée ou non, mais compte tenu de l'excrétion intermittente chez les bovins en début d'évolution, les conclusions peuvent être difficiles à tirer.

De manière globale, aucun effet protecteur de la vaccination sur la probabilité d'excrétion n'a été mis en évidence, par rapport aux bovins non vaccinés séronégatifs. Par rapport à ce groupe de référence, une tendance inverse a même été mise en évidence pour les bovins vaccinés séronégatifs, avec un odds ratio de 1.45 [IC95% : 0.92-2.28, p=0.108]. Seuls les bovins non vaccinés séropositifs étaient significativement plus à risque d'être excréteurs que les bovins non vaccinés séronégatifs (OR = 3.41, IC95% : 1.12-9.85, p=0.0249). Une tendance à la réduction du risque d'être excréteur pour les bovins vaccinés séropositifs (RR=0.39, IC95% : 0.12-1.23, p=0.11) ou séronégatifs (RR=0.42, IC95% : 0.13-1.29, p=0.134) par rapport aux bovins non vaccinés séropositifs a aussi été mise en évidence. Ces résultats demandent à être confortés ou infirmés par des effectifs plus importants. Cette absence d'effet clairement bénéfique de la vaccination est en contradiction avec les résultats d'autres études menées sur le Silirum® (Sweeney et al., 2009b ; Juste et al., 2009 ; Alonso-Hearn et al., 2012) ou avec d'autres vaccins (Bastida, Juste, 2011). Les schémas et conditions

d'étude (âge à la vaccination, pratiques d'élevage, pression d'infection) et d'évaluation du statut infectieux (culture sur tissus ou fèces ou qPCR sur fèces) pourraient être à l'origine de ces différences, qui restent difficiles à expliquer. L'étude de Juste *et al.* (2009), notamment, met en évidence une réduction significative de l'excrétion fécale. Cependant, cette étude estime et compare l'effet de la vaccination seule à une stratégie de dépistage et d'élimination des bovins infectés. Le dépistage (qPCR sur fèces) et l'élimination des bovins infectés permettrait une réduction de 60.4% de l'excrétion fécale en deux ans. La vaccination seule permettrait quant à elle d'atteindre une réduction de 85.8%. Dans notre étude, les deux stratégies sont combinées, pouvant réduire les effets bénéfiques de la vaccination d'un point de vue épidémiologique. Notons par ailleurs que dans la méta-analyse de Bastida et Juste (2011), 5 études sur 26 menées chez les bovins avec différents vaccins montraient l'absence d'amélioration (n=1), voire une détérioration (n=4) des indicateurs épidémiologiques (fréquence d'isolement de *Map* dans les fèces ou les tissus) suite à la vaccination.

L'effet de la vaccination semble par ailleurs très variable entre les élevages. Dans notre étude, l'analyse univariée lorsqu'elle a été possible compte tenu des effectifs, a montré une différence significative dans au moins un élevage, en faveur d'une réduction de la probabilité d'excrétion pour les bovins vaccinés. L'inverse a aussi été observé dans un autre élevage. Pour 3 autres élevages aucune différence significative n'a été mise en évidence et pour les 3 derniers, les effectifs sont trop faibles pour conclure. Là encore ces résultats demandent à être consolidés par l'inclusion d'un nombre plus important d'animaux. Ces différences d'effet entre élevages pourraient être liées aux conditions de conduite influençant la pression d'infection ou la sensibilité des animaux à l'infection.

D'après nos résultats, l'âge à la vaccination n'avait pas d'influence sur la probabilité d'excrétion ou sur le niveau d'excrétion. Ces résultats ne peuvent malheureusement être confrontés à aucune autre étude publiée, la vaccination étant réalisée de manière quasi systématique avant l'âge d'un mois. Pourtant des observations de terrain suggèrent que la vaccination d'animaux sub-adultes ou adultes pourrait induire des réponses immunitaires cellulaires et humorales plus marquées (Singh *et al.*, 2007 ; Windsor, 2006 ; Juste *et al.*, 2009). Dans une communication orale, une équipe espagnole indique cependant avoir mis en évidence des prévalences d'excrétion fécale significativement plus importantes chez des bovins vaccinés à plus de 6 mois d'âge (3.8%) que ceux vaccinés avant 3 mois (1.74%). Notons cependant que la classe des animaux plus âgés incluait une forte proportion de bovins vaccinés à l'âge adulte lors de la mise en place des plans de vaccination dans les 21 troupeaux

suivis, et que de nombreux biais entachent l'interprétation des résultats. Aussi la question de l'âge optimal auquel les animaux doivent être vaccinés, permettant d'allier la meilleure stimulation immunitaire possible et la limitation du risque d'infection dans la période pré-vaccinale, reste entière. Par ailleurs, cet âge pourrait être variable, les conditions d'expositions à *Map* étant très variables entre élevages.

## CONCLUSION

La paratuberculose est une maladie causant de fortes pertes économiques dans les élevages français. L'évolution lente de la maladie et la longue persistance de l'agent pathogène dans l'environnement rendent son éradication difficile. Les plans de lutte actuels basés sur le dépistage et l'élimination précoce des animaux infectés associés à des mesures sanitaires fournissent des résultats assez peu satisfaisants au regard des coûts et des contraintes de mise en œuvre très élevés. Dans ce contexte, la vaccination permettrait d'améliorer l'efficacité des plans de lutte.

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer le statut épidémiologique des élevages laitiers engagés dans un plan de lutte incluant la vaccination contre la paratuberculose dans le département de la Meuse. Le schéma d'étude et les données recueillies permettaient d'évaluer l'efficacité du vaccin Silirum® en étudiant les statuts sérologiques des animaux ainsi que le niveau d'excrétion fécale de *Map*. Nos résultats n'ont pas permis de conclure à un effet de la vaccination vis-à-vis de l'excrétion fécale, ni à quelconque différentiel lié à l'âge à la vaccination. En revanche, un fort effet de l'âge à la vaccination sur la réponse sérologique a été mis en évidence, qui reste à investiguer.

Nos observations restent cependant à consolider car elles reposent sur un grand nombre de bovins dont le statut infectieux n'a été établi qu'une seule fois, notamment pour les animaux vaccinés, et sur un nombre réduit de bovins vaccinés dans 3 des 8 troupeaux. La multiplication des prélèvements dans le temps, et l'inclusion de nouveaux animaux dans cette étude devrait permettre de consolider les conclusions quant aux effets du vaccin Silirum®.

Même si les résultats actuels ne sont pas en faveur d'une efficacité épidémiologique de l'utilisation du vaccin Silirum® dans les élevages suivis, le ressenti des éleveurs est très favorable. Une disparition totale des cas cliniques, associée à une amélioration des résultats sanitaires et zootechniques des exploitations est rapportée par tous. Cependant, les effets observés ne peuvent pas être imputés qu'à la vaccination. Les méthodes de dépistage et renouvellement associées aux mesures sanitaires mises en place depuis plusieurs années ont aussi un impact sur la présence et donc l'observation de la paratuberculose dans ces élevages. Il est difficile voire impossible d'évaluer le rôle seul de la vaccination dans les résultats présentés dans cette étude et dans le ressenti des éleveurs. Cependant, la poursuite des travaux engagés, notamment par l'exploitation des données de production dans ces élevages devrait

permettre d'évaluer de manière plus objective certains de ces éléments.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

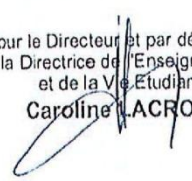
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, Fabien CORBIERE, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse commune de **Jeremy DURET** et **Kévin BALDET** intitulée « Vaccination contre la paratuberculose bovine : situation épidémiologique dans 8 élevages bovins laitiers de la Meuse » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 08/11/2019  
Docteur Fabien CORBIERE  
Maitre de Conférences  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Dr. F. CORBIERE*  

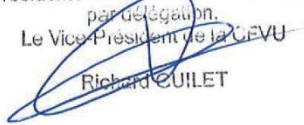

Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pierre SANS

Pour le Directeur et par délégation,  
la Directrice de l'Enseignement et de la Vie Etudiante  
Caroline LACROUX  


Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Eric OSWALD

 **Professeur Eric OSWALD**  
Chef de Service  
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène  
Institut Fédératif de Biologie  
330 av. de Grande Bretagne - TSA 40031  
31059 TOULOUSE CEDEX 9

Vu et autorisation de l'impression :  
Présidente de l'Université Paul Sabatier  
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

La Présidente de l'Université Paul Sabatier,  
par délégation,  
Le Vice-Président de la CFEVU  
Richard CUILET  


Mr Jeremy DURET et Mr Kévin BALDET  
ont respectivement été admis sur concours en : 2014  
ont obtenu leur diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018  
ont validé leur année d'approfondissement le : 16/07/2019  
n'ont plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

## BIBLIOGRAPHIE

ALONSO-HEARN, M., MOLINA, E., GEJO, M., VAZQUEZ, P., SEVILLA, I.A., GARRIDO, J.M. et JUSTE, R.A., 2012. Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. In : *Journal of Dairy Science*. février 2012. Vol. 95, n° 2, p. 618-629. DOI 10.3168/jds.2009-2860.

ALY, Sharif S., MANGOLD, Beverly L., WHITLOCK, Robert H., SWEENEY, Raymond W., ANDERSON, Randall J., JIANG, Jiming, SCHUKKEN, Ynte H., HOVINGH, Ernest, WOLFGANG, David, VAN KESSEL, Jo Ann S., KARNS, Jeffrey S., LOMBARD, Jason E., SMITH, Julia M. et GARDNER, Ian A., 2010. Correlation between Herrold Egg Yolk Medium Culture and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Results for *Mycobacterium Avium* Subspecies *Paratuberculosis* in Pooled Fecal and Environmental Samples. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. septembre 2010. Vol. 22, n° 5, p. 677-683. DOI 10.1177/104063871002200501.

BASTIDA, Felix et JUSTE, Ramon A, 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. In : *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*. 2011. Vol. 9, n° 1, p. 8. DOI 10.1186/1476-8518-9-8.

BOSSHARD, C., STEPHAN, R. et TASARA, T., 2006. Application of an F57 Sequence-Based Real-Time PCR Assay for *Mycobacterium paratuberculosis* Detection in Bulk Tank Raw Milk and Slaughtered Healthy Dairy Cows. In : *Journal of Food Protection*. juillet 2006. Vol. 69, n° 7, p. 1662-1667. DOI 10.4315/0362-028X-69.7.1662.

CETINKAYA, B., ERDOGAN, H. M. et MORGAN, K. L., 1998. Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. In : *Veterinary Record*. 5 septembre 1998. Vol. 143, n° 10, p. 265-269. DOI 10.1136/vr.143.10.265.

COLLINS, M. T., WELLS, S. J., PETRINI, K. R., COLLINS, J. E., SCHULTZ, R. D. et WHITLOCK, R. H., 2005. Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. In : *Clinical and Vaccine Immunology*. 1 juin 2005. Vol. 12, n° 6, p. 685-692. DOI 10.1128/CDLI.12.6.685-692.2005.

CORBETT, Caroline S., DE BUCK, Jeroen, ORSEL, Karin et BARKEMA, Herman W., 2017. Fecal shedding and tissue infections demonstrate transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in group-housed dairy calves. In : *Veterinary Research*. décembre 2017. Vol. 48, n° 1, p. 27. DOI 10.1186/s13567-017-0431-8.

CROSSLEY, Beate M., ZAGMUTT-VERGARA, Francisco J., FYOCK, Terry L., WHITLOCK, Robert H. et GARDNER, Ian A., 2005. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. In : *Veterinary Microbiology*. mai 2005. Vol. 107, n° 3-4, p. 257-263. DOI 10.1016/j.vetmic.2005.01.017.

EISENBERG, Susanne W. F., CHUCHAISANGRAT, Ruj, NIELEN, Mirjam et KOETS, Ad P., 2013. Relationship between Presence of Cows with Milk Positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Specific Antibody by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Viable *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in Dust in Cattle Barns. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 15 septembre 2013. Vol. 79, n° 18, p. 5458-5464. DOI 10.1128/AEM.01187-13.



ELGUEZABAL, Natalia, BASTIDA, Felix, SEVILLA, Iker A., GONZÁLEZ, Nuria, MOLINA, Elena, GARRIDO, Joseba M. et JUSTE, Ramón A., 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Growth Parameters: Strain Characterization and Comparison of Methods. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 15 décembre 2011. Vol. 77, n° 24, p. 8615-8624. DOI 10.1128/AEM.05818-11.

ESPY, M J, UHL, J R, SLOAN, L M, BUCKWALTER, S P, JONES, M F, VETTER, E A, YAO, J D C, WENGENACK, N L, ROSENBLATT, J E, III, F R Cockerill et SMITH, T F, 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. In : *CLIN. MICROBIOL. REV.* 2006. Vol. 19, p. 93.

FRY, M. Paulina, KRUIZE, Juan et COLLINS, Michael T., 2008. Evaluation of four commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* mai 2008. Vol. 20, n° 3, p. 329-332. DOI 10.1177/104063870802000311.

GARRIDO, Joseba M., VAZQUEZ, Patricia, MOLINA, Elena, PLAZAOLA, Jose M., SEVILLA, Iker A., GEIJO, Maria V., ALONSO-HEARN, Marta et JUSTE, Ramon A., 2013. Paratuberculosis Vaccination Causes Only Limited Cross-Reactivity in the Skin Test for Diagnosis of Bovine Tuberculosis. In : SAMUEL, James E. (éd.), *PLoS ONE*. 26 novembre 2013. Vol. 8, n° 11, p. e80985. DOI 10.1371/journal.pone.0080985.

GONZÁLEZ, J., GEIJO, M.V., GARCÍA-PARIENTE, C., VERNA, A., CORPA, J.M., REYES, L.E., FERRERAS, M.C., JUSTE, R.A., GARCÍA MARÍN, J.F. et PÉREZ, V., 2005. Histopathological Classification of Lesions associated with Natural Paratuberculosis Infection in Cattle. In : *Journal of Comparative Pathology*. août 2005. Vol. 133, n° 2-3, p. 184-196. DOI 10.1016/j.jcpa.2005.04.007.

GROENENDAAL, Huybert, NIELEN, Mirjam et HESSELINK, Jan Willem, 2003. Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model. In : *Preventive Veterinary Medicine*. juillet 2003. Vol. 60, n° 1, p. 69-90. DOI 10.1016/S0167-5877(03)00083-7.

GUPTA, Radhey S., LO, Brian et SON, Jeen, 2018. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. In : *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 13 février 2018. Vol. 9. [Consulté le 23 juin 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2018.00067. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00067/full>.

J.G. BROTHERSTON, N.J.L. GILMOUR et J.MCA. SAMUEL, 1961. Quantitative Studies of *Mycobacterium Johnei* in the Tissues of Sheep: I. Routes of Infection and Assay of Viable *M. johnei*. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. In : . 1961.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.J, KANEENE, J.B, SPRECHER, D.J, GARDINER, J.C et LLOYD, J.W, 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. In : *Preventive Veterinary Medicine*. août 2000. Vol. 46, n° 3, p. 171-181. DOI 10.1016/S0167-5877(00)00145-8.

JORGENSEN, JB, 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. In : *Nordisk veterinærmedicin*. juin 1977. Vol. 29, n° 6, p. 267—270.

JUSTE, Ramon A, ALONSO-HEARN, Marta, MOLINA, Elena, GEIJO, Marivi, VAZQUEZ, Patricia, SEVILLA, Iker A et GARRIDO, Joseba M, 2009. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. In : *BMC Research Notes*. 2009. Vol. 2, n° 1, p. 233. DOI 10.1186/1756-0500-2-233.

KHOL, J.L., WASSERTHEURER, M., SODOMA, E., REVILLA-FERNÁNDEZ, S., DAMOSER, J., ÖSTERREICHER, E., DÜNSER, M., KLEB, U. et BAUMGARTNER, W., 2013. Long-term detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in individual and bulk tank milk from a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. In : *Journal of Dairy Science*. juin 2013. Vol. 96, n° 6, p. 3517-3524. DOI 10.3168/jds.2012-6466.

KRALIK, Petr, PRIBYLOVA-DZIEDZINSKA, Radka, KRALOVA, Alena, KOVARCIK, Kamil et SLANA, Iva, 2014. Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a Limousin cattle herd. In : *The Veterinary Journal*. juillet 2014. Vol. 201, n° 1, p. 91-94. DOI 10.1016/j.tvjl.2014.02.011.

LAFORT, Marie-Pierre, 2015. La paratuberculose chez les ovins : effet de la vaccination sur la réponse sérologique et l'excrétion fécale de *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map). In : . 2015. p. 93.

LI, L., BANNANTINE, J. P., ZHANG, Q., AMONSIN, A., MAY, B. J., ALT, D., BANERJI, N., KANJILAL, S. et KAPUR, V., 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 30 août 2005. Vol. 102, n° 35, p. 12344-12349. DOI 10.1073/pnas.0505662102.

MARCÉ, C., BEAUDEAU, F., BAREILLE, N., SEEGER, H. et FOURICHON, C., 2009. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early stage in Holstein dairy cows. In : *Theriogenology*. mars 2009. Vol. 71, n° 5, p. 807-816. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.10.017.

MATHEVON ET AL., 2015. La vaccination contre la paratuberculose ovine : développements méthodologiques et évaluation de son efficacité. In : . 2015.

MCALOON, Conor G., WHYTE, Paul, MORE, Simon J., GREEN, Martin J., O'GRADY, Luke, GARCIA, AnaBelen et DOHERTY, Michael L., 2016. The effect of paratuberculosis on milk yield—A systematic review and meta-analysis. In : *Journal of Dairy Science*. février 2016. Vol. 99, n° 2, p. 1449-1460. DOI 10.3168/jds.2015-10156.

MITCHELL, R. M., MEDLEY, G. F., COLLINS, M. T. et SCHUKKEN, Y. H., 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. In : *Epidemiology and Infection*. février 2012. Vol. 140, n° 2, p. 231-246. DOI 10.1017/S0950268811000689.

MITCHELL, Rebecca M, SCHUKKEN, Ynte, KOETS, Ad, WEBER, Maarten, BAKKER, Douwe, STABEL, Judy, WHITLOCK, Robert H et LOUZOUN, Yoram, 2015. Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections in cattle. In : *Veterinary Research*. décembre 2015. Vol. 46, n° 1, p. 66. DOI 10.1186/s13567-015-0188-x.

MORTIER, Rienske A.R., BARKEMA, Herman W. et DE BUCK, Jeroen, 2015. Susceptibility to and diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in dairy calves: A review. In : *Preventive Veterinary Medicine*. octobre 2015. Vol. 121, n° 3-4, p. 189-198. DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.08.011.

MUÑOZ M, MORENO O, FUERTES M, DOCE J, PUENTES E, GARRIDO J, PÉREZ V, GARCÍA MARÍN JF et GARCÍA-PARIENTE C, 2005. Efficacy of a killed vaccine (Silirum®) in calves challenged with Map. In : . 2005.

NIELSEN, Søren Saxmose et TOFT, Nils, 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. In : *Preventive Veterinary Medicine*. janvier 2009. Vol. 88, n° 1, p. 1-14. DOI 10.1016/j.prevetmed.2008.07.003.

NIELSEN, Søren Saxmose et TOFT, Nils, 2012. Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cattle. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. septembre 2012. Vol. 149, n° 1-2, p. 6-10. DOI 10.1016/j.vetimm.2012.05.013.

NIELSEN, S.S. et TOFT, N., 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. In : *Veterinary Microbiology*. juin 2008. Vol. 129, n° 3-4, p. 217-235. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.12.011.

OTT, Stephen L., WELLS, Scott J. et WAGNER, Bruce A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. In : *Preventive Veterinary Medicine*. juin 1999. Vol. 40, n° 3-4, p. 179-192. DOI 10.1016/S0167-5877(99)00037-9.

PAYNE, J.M. et RANKIN, J. Deans, 1961. A Comparison of the Pathogenesis of Experimental Johne's Disease in Calves and Cows. In : *Research in Veterinary Science*. 1 avril 1961. Vol. 2, n° 2, p. 175-179. DOI 10.1016/S0034-5288(18)34971-3.

PLAIN, K. M., MARSH, I. B., WALDRON, A. M., GALEA, F., WHITTINGTON, A.-M., SAUNDERS, V. F., BEGG, D. J., DE SILVA, K., PURDIE, A. C. et WHITTINGTON, R. J., 2014. High-Throughput Direct Fecal PCR Assay for Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Sheep and Cattle. In : *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mars 2014. Vol. 52, n° 3, p. 745-757. DOI 10.1128/JCM.03233-13.

PRADHAN, A. K., MITCHELL, R. M., KRAMER, A. J., ZURAKOWSKI, M. J., FYOCK, T. L., WHITLOCK, R. H., SMITH, J. M., HOVINGH, E., VAN KESSEL, J. A. S., KARNIS, J. S. et SCHUKKEN, Y. H., 2011. Molecular Epidemiology of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in a Longitudinal Study of Three Dairy Herds. In : *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mars 2011. Vol. 49, n° 3, p. 893-901. DOI 10.1128/JCM.01107-10.

REDDACLIFF, L., EPPLESTON, J., WINDSOR, P., WHITTINGTON, R. et JONES, S., 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. In : *Veterinary Microbiology*. 15 juin 2006. Vol. 115, n° 1-3, p. 77-90. DOI 10.1016/j.vetmic.2005.12.021.

ROSSEELS, Valérie et HUYGEN, Kris, 2008. Vaccination against paratuberculosis. In : *Expert Review of Vaccines*. août 2008. Vol. 7, n° 6, p. 817-832. DOI 10.1586/14760584.7.6.817.

ROSSI, G., GROHN, Y.T., SCHUKKEN, Y.H. et SMITH, R.L., 2017. The effect of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. In : *Journal of Dairy Science*. septembre 2017. Vol. 100, n° 9, p. 7446-7454. DOI 10.3168/jds.2017-12721.

SERRANO, Miriam, ELGUEZABAL, Natalia, SEVILLA, Iker A., GEIJO, María V., MOLINA, Elena, ARRAZURIA, Rakel, URKITZA, Alfonso, JONES, Gareth J., VORDERMEIER, Martin, GARRIDO, Joseba M. et JUSTE, Ramón A., 2017. Tuberculosis Detection in Paratuberculosis Vaccinated Calves: New Alternatives against Interference. In : SREEVATSAN, Srinand (éd.), *PLOS ONE*. 10 janvier 2017. Vol. 12, n° 1, p. e0169735. DOI 10.1371/journal.pone.0169735.

SHRESTHA, Shailesh, VOSOUGH AHMADI, Bouda, BARRATT, Alyson S., THOMSON, Steven G. et STOTT, Alistair W., 2018. Financial Vulnerability of Dairy Farms Challenged by Johne's Disease to Changes in Farm Payment Support. In : *Frontiers in Veterinary Science* [en ligne]. 18 décembre 2018. Vol. 5. [Consulté le 22 juin 2019]. DOI 10.3389/fvets.2018.00316. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2018.00316/full>.

SINGH, S.V., SINGH, P.K., SINGH, A.V., SOHAL, J.S., GUPTA, V.K. et VIHAN, V.S., 2007. Comparative efficacy of an indigenous 'inactivated vaccine' using highly pathogenic field strain of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis 'Bison type' with a commercial vaccine for the control of Capri-paratuberculosis in India. In : *Vaccine*. octobre 2007. Vol. 25, n° 41, p. 7102-7110. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.07.054.

STABEL, J.R., BRADNER, L., ROBBE-AUSTERMAN, S. et BEITZ, D.C., 2014. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. In : *Journal of Dairy Science*. octobre 2014. Vol. 97, n° 10, p. 6296-6304. DOI 10.3168/jds.2014-8204.

STEPHAN, Joachim, BENDER, Jennifer, WOLSCHEENDORF, Frank, HOFFMANN, Christian, ROTH, Eva, MAILÄNDER, Claudia, ENGELHARDT, Harald et NIEDERWEIS, Michael, 2005. The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients: Porins and growth of *M. smegmatis*. In : *Molecular Microbiology*. novembre 2005. Vol. 58, n° 3, p. 714-730. DOI 10.1111/j.1365-2958.2005.04878.x.

SWEENEY, Raymond W., 2011. Pathogenesis of Paratuberculosis. In : *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. novembre 2011. Vol. 27, n° 3, p. 537-546. DOI 10.1016/j.cvfa.2011.07.001.

SWEENEY, Raymond W., WHITLOCK, Robert H., BOWERSOCK, Terry L., CLEARY, Diane L., MEINERT, Todd R., HABECKER, Perry L. et PRUITT, Greg W., 2009a. Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. In : *American Journal of Veterinary Research*. avril 2009. Vol. 70, n° 4, p. 493-497. DOI 10.2460/ajvr.70.4.493.

SWEENEY, Raymond W., WHITLOCK, Robert H., BOWERSOCK, Terry L., CLEARY, Diane L., MEINERT, Todd R., HABECKER, Perry L. et PRUITT, Greg W., 2009b. Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* vaccine

on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. In : *American Journal of Veterinary Research*. avril 2009. Vol. 70, n° 4, p. 493-497. DOI 10.2460/ajvr.70.4.493.

SWEENEY, Raymond W, WHITLOCK, Robert H et ROSENBERGER, Anne E, 1992. Mycobacterium paratuberculosis Cultured from Milk and Supramammary Lymph Nodes. of Infected Asymptomatic Cows. In : *J. CLIN. MICROBIOL*. 1992. Vol. 30, p. 6.

SWEENEY, R.W., UZONNA, J., WHITLOCK, R.H., HABECKER, P.L., CHILTON, P. et SCOTT, P., 2006. Tissue predilection sites and effect of dose on Mycobacterium avium subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. In : *Research in Veterinary Science*. juin 2006. Vol. 80, n° 3, p. 253-259. DOI 10.1016/j.rvsc.2005.07.007.

TEWARI, Deepanker, HOVINGH, Ernest, LINSCOTT, Rick, MARTEL, Edmond, LAWRENCE, John, WOLFGANG, David et GRISWOLD, David, 2014. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Antibody Response, Fecal Shedding, and Antibody Cross-Reactivity to Mycobacterium bovis in M. avium subsp. paratuberculosis-Infected Cattle Herds Vaccinated against Johne's Disease. In : WATERS, W. R. (éd.), *Clinical and Vaccine Immunology*. mai 2014. Vol. 21, n° 5, p. 698-703. DOI 10.1128/CVI.00032-14.

THOMSEN, Vibeke Thulstrup, NIELSEN, Søren Saxmose, THAKUR, Aneesh et JUNGENSEN, Gregers, 2012. Characterization of the long-term immune response to vaccination against Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Danish dairy cows. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. janvier 2012. Vol. 145, n° 1-2, p. 316-322. DOI 10.1016/j.vetimm.2011.11.021.

VAN ROERMUND, H.J.W., BAKKER, D., WILLEMSSEN, P.T.J. et DE JONG, M.C.M., 2007. Horizontal transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle in an experimental setting: Calves can transmit the infection to other calves. In : *Veterinary Microbiology*. juin 2007. Vol. 122, n° 3-4, p. 270-279. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.01.016.

WHITLOCK, R H, WELLS, S J, SWEENEY, R W et TIEM, J Van, 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. In : *Veterinary Microbiology*. 2000. p. 12.

WHITTINGTON, R. J., MARSH, I. B. et REDDAKLIFF, L. A., 2005. Survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Dam Water and Sediment. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 septembre 2005. Vol. 71, n° 9, p. 5304-5308. DOI 10.1128/AEM.71.9.5304-5308.2005.

WHITTINGTON, R. J., MARSHALL, D. J., NICHOLLS, P. J., MARSH, I. B. et REDDAKLIFF, L. A., 2004. Survival and Dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the Environment. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 mai 2004. Vol. 70, n° 5, p. 2989-3004. DOI 10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004.

WHITTINGTON, Richard, DONAT, Karsten, WEBER, Maarten F., KELTON, David, NIELSEN, Søren Saxmose, EISENBERG, Suzanne, ARRIGONI, Norma, JUSTE, Ramon, SÁEZ, Jose Luis, DHAND, Navneet, SANTI, Annalisa, MICHEL, Anita, BARKEMA, Herman, KRALIK, Petr, KOSTOULAS, Polychronis, CITER, Lorna, GRIFFIN, Frank, BARWELL, Rob, MOREIRA, Maria Aparecida Scatamburlo, SLANA, Iva, KOEHLER,

Heike, SINGH, Shoor Vir, YOO, Han Sang, CHÁVEZ-GRIS, Gilberto, GOODRIDGE, Amador, OCEPEK, Matjaz, GARRIDO, Joseba, STEVENSON, Karen, COLLINS, Mike, ALONSO, Bernardo, CIRONE, Karina, PAOLICCHI, Fernando, GAVEY, Lawrence, RAHMAN, Md Tanvir, DE MARCHIN, Emmanuelle, VAN PRAET, Willem, BAUMAN, Cathy, FECTEAU, Gilles, MCKENNA, Shawn, SALGADO, Miguel, FERNÁNDEZ-SILVA, Jorge, DZIEDZINSKA, Radka, ECHEVERRÍA, Gustavo, SEPPÄNEN, Jaana, THIBAUT, Virginie, FRIDRIKSDOTTIR, Vala, DERAKHSHANDEH, Abdolah, HAGHKHAH, Masoud, RUOCCO, Luigi, KAWAJI, Satoko, MOMOTANI, Eiichi, HEUER, Cord, NORTON, Solis, CADMUS, Simeon, AGDESTAIN, Angelika, KAMPEN, Annette, SZTEYN, Joanna, FRÖSSLING, Jenny, SCHWAN, Ebba, CALDOW, George, STRAIN, Sam, CARTER, Mike, WELLS, Scott, MUNYEME, Musso, WOLF, Robert, GURUNG, Ratna, VERDUGO, Cristobal, FOURICHON, Christine, YAMAMOTO, Takehisa, THAPALIYA, Sharada, DI LABIO, Elena, EKGATAT, Monaya, GIL, Andres, ALESANDRE, Alvaro Nuñez, PIAGGIO, José, SUANES, Alejandra et DE WAARD, Jacobus H., 2019. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. In : *BMC Veterinary Research* [en ligne]. 13 juin 2019. Vol. 15. [Consulté le 25 septembre 2019]. DOI 10.1186/s12917-019-1943-4. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6567393/>.

WHITTINGTON, Richard J. et WINDSOR, Peter A., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: A critical review and meta-analysis. In : *The Veterinary Journal*. janvier 2009. Vol. 179, n° 1, p. 60-69. DOI 10.1016/j.tvjl.2007.08.023.

WHITTINGTON, Rj, REDDACLIFF, La, MARSH, I., MCALLISTER, S. et SAUNDERS, V., 2000. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in sheep with Johne's disease. In : *Australian Veterinary Journal*. janvier 2000. Vol. 78, n° 1, p. 34-37. DOI 10.1111/j.1751-0813.2000.tb10355.x.

WINDSOR, P., 2006. Research into vaccination against ovine Johne's disease in Australia. In : *Small Ruminant Research*. mars 2006. Vol. 62, n° 1-2, p. 139-142. DOI 10.1016/j.smallrumres.2005.07.044.

WINDSOR, Peter A. et WHITTINGTON, Richard J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. In : *The Veterinary Journal*. avril 2010. Vol. 184, n° 1, p. 37-44. DOI 10.1016/j.tvjl.2009.01.007.

ZANETTI, Stefania, MOLICOTTI, Paola, CANNAS, Sara, ORTU, Silvia, AHMED, Niyaz et SECHI, Leonardo A, 2006. « In vitro » activities of antimycobacterial agents against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis linked to Crohn's Disease and Paratuberculosis. In : *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006. p. 3.

TOULOUSE 2019

NOMS : BALDET

DURET

PRENOMS : Kévin

Jeremy

TITRE : Vaccination contre la paratuberculose bovine : situation épidémiologique dans 8 élevages bovins laitiers de la Meuse.

RESUME : L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les effets du vaccin Silirum® sur le statut sérologique et l'excrétion fécale de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*), dans le cadre des plans de lutte contre la paratuberculose bovine dans la Meuse. Le statut sérologique (ELISA) et l'excrétion fécale (qPCR) ont été évalués de manière longitudinale à plusieurs reprises sur une période de 1 an chez 486 vaches laitières (249 non vaccinés et 237 vaccinés) âgées de 4 à 6 ans dans 8 élevages infectés de la Meuse. Les résultats des analyses sérologiques indiquent que l'intensité de la réponse humorale post-vaccinale est non constante, seuls 36.3% des bovins vaccinés étant séropositifs. Par ailleurs, un fort effet de l'âge à la vaccination a été mis en évidence, qui reste à investiguer. Concernant l'excrétion fécale, nos résultats n'ont pas permis de conclure à un effet de la vaccination ni à quelconque différentiel lié à l'âge à la vaccination.

MOTS-CLES : Paratuberculose ; Bovins ; Vaccination ; Sérologie ELISA ; qPCR ; excrétion fécale

---

TITLE: Vaccination against paratuberculosis in cattle: epidemiology status of 8 dairy herds in Meuse department, France.

ABSTRACT: The main objective of this study was to evaluate the effect of Silirum® vaccine on the serological status and faecal shedding of *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*), as part of paratuberculosis control plans in the Meuse department, France. To this end, the serological status (ELISA) and faecal shedding (qPCR) were repeatedly assessed over a one-year period in 486 dairy cows (249 unvaccinated and 237 vaccinated) aged between 4 and 6 years in 8 infected herds. The serum ELISA results indicate that the intensity of the post-vaccination humoral response is not constant, only 36.3% of the vaccinated cattle being seropositive. In addition, a strong effect of age at vaccination has been highlighted, which remains to be investigated. With respect to faecal excretion, our results did not conclude that there was an effect of vaccination or any age-related effect.

KEYWORDS: Paratuberculosis ; Dairy cattle ; Vaccination ; ELISA Serology ; qPCR ; Faecal shedding