

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE

PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE DOCTEUR VETERINAIRE

SOUS LE THEME

*Etude anatomopathologique de la
paratuberculose chez les ruminants*

PRESENTE PAR :

MLLE : SENOUCI HOURIA

MLLE : GUETTAF FATIMA ZOHRA

ENCADRE PAR :

DR : HEMIDA HOUARI



Remerciement

Tout d'abord je tiens à remercier DIEU clément et miséricordieux de nos avoir donné

Le courage, la patience et la santé de mener à bien ce modeste travail.

*Nous remercions très vivement notre promoteur Monsieur **Houari Saïd Ibrahim Hemida** pour son encouragement et écoute à notre égard et son entière disponibilité.*

Nos remerciements vont aussi : A tous ceux qui de près ou de loin ont participé

A la réalisation de ce travail.

A tous mes professeurs du département des sciences vétérinaires de Faculté des sciences

Agrovétérinaires de l'université IBN KHALDOUN de Tiaret Algérie.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	
LISTE DES TABLEAUX.....	
INTRODUCTION.....	01
CHAPITRE 1 : RAPPELS SUR LA PARATUBERLOSE BOVINE	
1 - ETIOLOGIE	02
1.1 – Classification.....	03
1.2 - Morphologie	04
1.3 - Culture, caractères biochimiques	04
1.4 - Résistance	05
2 - EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE	07
2.1 - Situation nationale	07
2.2 - Situation internationale	07
3 - EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE	09
3.1 - Espèces atteintes	09
3.2 - Sources et matières virulentes.....	10
3.3 - Modalités de transmission	12
3.3.1 - Transmission horizontale	12
3.3.2 - Transmission verticale.....	13
3.4 - Facteurs de réceptivité et sensibilité	15
3.4.1 - Facteurs intrinsèques.....	15
3.4.2 - Facteurs extrinsèques	16
4 - PATHOGENIE	17
4.1 - Devenir du germe dans l'organisme	17
4.1.1 - Portes d'entrées et extension locale.....	17
4.1.2 – Bactériémie.....	18
4.2 - Evolution et particularités de la réponse immunitaire	18
4.2.1 - La réponse immunitaire non spécifique.....	18
4.2.2 - L'immunité cellulaire	19

4.2.3 - L'immunité humorale	21
4.2.4 - Variation de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'infection par M. Paratuberculosis	22
5- IMPACT ECONOMIQUE	24
5.1 - En troupeau laitier	25
5.1.1 - Les effets sur la production	25
5.1.2 - Les effets sur la santé et la reproduction	25
5.1.3 - Effets sur l'état corporel et les réformes	26
5.2 - En troupeau allaitant	27

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE BOVINE ET MOYENS DE LUTT

1 – DIAGNOSTIC CLINIQUE	28
1.1 – Symptômes	28
1.1.1 - Stade 1 : Infection silencieuse	29
1.1.2 - Stade 2 : Maladie subclinique.....	30
1.1.3 - Stade 3 : Affection clinique	31
1.1.4 - Stade 4 : Affection clinique en fin d'évolution	32
1.2 - Les lésions anatomie-histopathologie.....	32
1.2.1 - Lésions macroscopiques.....	32
1.2.2 - Lésions microscopiques.....	33
2 - Diagnostic de laboratoire	34
2.1 - Les Tests de diagnostic direct	35
2.1.1 - La bactérioscopie	35
2.1.2 - La culture	36
2.1.3 - La PCR (Polymérase Chain Réaction).....	38
2.2 - Les tests de diagnostic indirect.....	39
2.2.1 - Exploration de la réponse immunitaire cellulaire	39
2.2.2 - Détection de la réponse immunitaire humorale	41

3 - Utilisation recommandée des tests selon la situation	43
3.1 - Confirmation d'un diagnostic clinique.....	43
3.2 - Confirmation de résultats positifs	43
3.3 - Estimation de la prévalence de la paratuberculose dans un troupeau	44
3.4 - Maîtrise de la paratuberculose	44
3.5 - Tests d'achat	45
3.6 - Tests d'exportation.....	46
4-TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE	48
4.1 - Traitement	48
4.2 - Prophylaxie :	48
4.2.1 - Prophylaxie médicale : la vaccination.....	48
4.2.2 - Prophylaxie sanitaire	51
4.2.2.1 - Conduite des veaux à la naissance	51
4.2.2.2 - Conduite de l'élevage des veaux	51
4.2.2.3 - Conduite des animaux malades	52
4.2.2.4 - Conduite du troupeau adulte	52

LA PARTIE EXPERIMENTALE

1-Matériel.....	54
2-Méthodes.....	55
2-1-Méthodes macroscopique.....	55
2-2-Méthodes microscopique.....	55
2-2-1-prélèvement et fixation.....	55
2-2-2- Classification	55
2-2-2-1-technique manuelle.....	56
2-2-2-2-technique automatique.....	56
2-2-3-confection du boc.....	56

2-2-4-microtomie.....	57
2-2-5-coloration.....	57
2-2-6-montage des lames.....	58
2-2-7-observation des prélèvements histologiques.....	59
1-aspect de l'épithélium liminal.....	59
2-infiltration cellulaire inflammatoire du stroma conjonctif.....	59
3-Résultats et discussion	60
4-Conclusion.....	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
01	Caractères utiles au diagnostic différentiel des sous-espèces de <i>Mycobacterium avium</i>	03
02	Diagnostic différentiel des diarrhées chroniques chez les bovins.	47

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	Modalités de la contamination d'un cheptel	14
02	Répartition des animaux infectés en fonction du stade d'infection	23
03	Variation de la réponse immunitaire en fonction du temps	29
04	Intestin, bovin, villosités intestinales normales. H&E, 10x.	61
05	Intestin, bovin, cryptes de Lieberkühn. H&E, 40x	61
06	Intestin, bovin, infiltration de la muqueuse intestinale par une population inflammatoire mononucléaire. H&E, 10x	61
07	Intestin, bovin, infiltration de la muqueuse intestinale par une population inflammatoire mononucléaire. H&E, 40x.	61
08	Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde des plaques de Peyer. H&E, 10x	61
09	Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde qui engendre un épaissement de la muqueuse (flèche bleue). H&E, 10x.	61
10	Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde qui progresse vers la lumière intestinale (L, lumière).	62

H&E, 10x.

- 11 Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde qui progresse vers la lumière intestinale (L, lumière). H&E, 10x. 62
- 12 Ganglion lymphatique mésentérique, bovin, infiltration du sinus p cortical par des lymphocytes (SPC, sinus para-cortical). H&E, 10 62
- 13 Ganglion lymphatique mésentérique, bovin, infiltration du sinus p cortical par des lymphocytes. H&E, 40x 62

Introduction

INTRODUCTION

La paratuberculose ou maladie de Johne'' est due à la présence et la multiplication dans l'organisme d'une mycobactérie à croissance lente du nom de *Mycobacterium paratuberculosis*. Elle est présente dans le monde entier. Cette maladie est chronique, infectieuse, contagieuse et d'allure enzootique, propre aux ruminants. Elle touche aussi bien le troupeau laitier qu'allaitant. Elle se caractérise cliniquement par une diarrhée incoercible accompagnée d'un amaigrissement progressif de l'animal.

Cette infection provoque des pertes économiques importantes visibles (abattage de bovins de moindre valeur commerciale) mais aussi des pertes financières souvent plus insidieuses.

CHAPITRE I :
Rappels Sur La Paratuberculose Chez Les
Ruminants

1 – ETIOLOGIE :

1.1 Classification :

Le bacille de Johne appartient à l'ordre des Actinomycétales, à la famille des Mycobacteriaceae, au genre *Mycobacterium* et l'espèce *Mycobacterium avium* (DOUART A.2000.) L'espèce *Mycobacterium avium* est à présent divisée en trois sous-espèces suite à des études d'hybridation d'ADN et des analyses taxonomiques : *M. avium subsp. avium* (*M. avium*), *M. avium subsp. paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*), et *M. avium subsp. silvaticum* (*M. silvaticum*) (HARRIS N.B., BARLETTA R.G.2001)

Ces trois sous-espèces partagent de nombreuses similitudes génotypiques. *M. paratuberculosis* possède en effet plus de 99% d'ADN en commun avec *M. avium* ; cependant, les différences écologiques sont considérables. *M. paratuberculosis* se distingue des deux autres sous-espèces phénotypiquement par son habitat, son pouvoir pathogène, sa dépendance en mycobactine *in vitro* (MANNING E.J.B., COLLINS M.T.2001) (Tableau 01), et génotypiquement par la présence de multiples copies d'une séquence d'insertion nommée IS900.(HARRIS N.B., BARLETTA R.G.2001)

Tableau 01: Caractères utiles au diagnostic différentiel des sous-espèces de *Mycobacterium avium*. (DOUART A.2000)

	<i>M.avium subsp avium</i>	<i>M.asvium subsp paratuberculosis</i>	<i>M.avium subsp silvaticum</i>
<i>Habitat principal</i>	<i>Milieu exterieur</i>	<i>Parasite oblligatoire du ruminants</i>	<i>Parasite obligatoire des ruminants et des oiseauxss</i>
<i>Pouvoir pathogene</i>	<i>Tuberculose des oiseaux, diverses infections chez l'homme et les oiseaux</i>	<i>Paratuberculose des ruminants</i>	<i>Tuberculose des oiseaux et paratuberculose des ruminants</i>
<i>Aspect des colonies</i>	<i>Lisses</i>	<i>rugueuses</i>	<i>Rugueuses</i>
<i>Exigence en mycobactine (2mg /l)</i>	- /+	+	-
<i>Croissance sur milieu à l'œuf</i>	+	+	(-)

1.2 Morphologie :

Le bacille para tuberculeux a une forme d'un bâtonnet de petite taille (0,5x1 ou 2 micromètres), arrondi à ses extrémités, immobile, non capsulé et non sporulé. Bien que classé parmi les germes Gram-positifs, il se colore difficilement par la coloration de GRAM. Aussi, la coloration de Ziehl Nielsen qui s'appuie sur la décoloration du bacille par l'acide et l'alcool est plus fréquemment employée. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* est en effet une bactérie alcoolo-acido résistante. Les bacilles s'agglutinent en amas dans les produits soumis à la bactérioscopie (tissus et fèces). (GRANGE J.M.1987)

1.3 - Culture, caractères biochimiques :

M. paratuberculosis appartient au groupe des mycobactéries à croissance lente, incolores ou non chromogènes. *M. paratuberculosis* se distingue des autres souches de son groupe par sa dépendance à l'égard du facteur de croissance constitué par la mycobactine. Cette dernière est un composé liposoluble contenu dans la paroi bactérienne favorisant le transfert actif du fer. Elle est produite par la plupart des mycobactéries, mais *M. paratuberculosis* ne la produit pas ou pas assez in vitro. Ainsi cette dépendance en mycobactine a longtemps été considérée comme un critère d'identification de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en culture.

Cependant ce critère n'est pas absolu puisque ce même caractère a pu également être observé au sein du groupe *avium*(GRANGE J.M.1987)

La croissance de *M. paratuberculosis* est longue et difficile : il faut environ 8 à 12 semaines, voire 16 semaines avant de pouvoir observer de petites

colonies fermes et souvent blanches. Cette lenteur de développement rend la culture de *M. paratuberculosis* sensible aux agents contaminants opportunistes dont la croissance est beaucoup plus rapide. L'ajout de décontaminant (chlorure de benzalconium ou d'hexadécyl-pyridinium) est donc indispensable (**GRANGE J.M.1987**)

Ainsi *M. paratuberculosis* est cultivé sur un milieu d'Herrold, complété en mycobactine et décontaminant (le jaune d'œuf contenu dans ce milieu permettant de neutraliser le pouvoir bactéricide des décontaminant) (**GRANGE J.M.1987**)

1.4 – Résistance :

Les Mycobactéries sont connues pour leur résistance aux facteurs physiques et chimiques. Mais *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* fait partie des germes les plus résistants de son groupe. Ceci explique la capacité de cet organisme à persister dans l'environnement.

(**MANNING E.J.B., COLLINS M.T.2001**)

Des séries d'études ont été menées en 1944 par Lovell *et al.* afin de récolter des informations sur cette capacité de *M. paratuberculosis* à persister dans l'environnement : ils ont recueilli des matières fécales de bovins naturellement infectés et les ont soumises à diverses conditions naturelles telles le gel, le soleil, la pluie, la sécheresse, les changements de température, tentant ensuite régulièrement de réisoler *M. paratuberculosis*. En général, *M. paratuberculosis* survivait dans les matières fécales de 152 à 246 jours selon les conditions. (**MANNING E.J.B., COLLINS M.T.2001**)

Les auteurs en ont conclu que les pâtures pouvaient être considérées comme source d'infection encore au moins une année après la contamination. Le temps de survie de *M. paratuberculosis* dans le sol serait réduit par différents facteurs tels l'assèchement, le soleil, les pH basiques, les faibles teneurs en fer et les fortes teneurs en calcium (**MANNING E.J.B., COLLINS M.T.2001**)

Ainsi différentes études ont démontré une relation entre le type de sol et l'incidence de la paratuberculose. Une plus haute prévalence d'infection sur sols acides par rapport aux sols alcalins a été par exemple signalée aux U.S.A. (**RADOSTIS O.M., BLOOD D.C., GAY C.C.1994**). Aux Pays-Bas, une haute prévalence de cas cliniques de paratuberculose a été constatée dans une région au sol acide et déficient en calcium. De même, Johnson-Ilfearulundu et Kaneene ont publié une analyse épidémiologique approfondie à ce sujet en 1997 ; ils rapportent une étude menée au Michigan aux USA selon laquelle le chaulage des pâtures (pratique permettant d'augmenter le pH du sol) serait associé à une forte baisse de probabilité pour un troupeau bovin laitier d'être positif aux tests sérologiques vis-à-vis d'une infection par *Mycobacterium paratuberculosis*.

Cependant la cause de ces relations est encore mal définie et aucune étude n'a été entreprise afin de vérifier si le type de sol affecte réellement

La survie de *M. paratuberculosis*, ni pour expliquer les différents mécanismes mis en jeu. (**JOHNSON-IFEARULUNDU J., KANEENE J.B.1997**)

Le germe survit donc très longtemps dans le milieu extérieur : 163 jours dans l'eau de rivière, 270 jours dans l'eau stagnante de mare, 11 mois dans les fèces de bovins, 7 jours dans l'urine, au moins un an à -14°C [9]. Grant rapporte également que *M. paratuberculosis* serait capable de survivre aux conditions

appliquées lors de la pasteurisation du lait (72°C pendant 15 secondes) (GRANT I.R., 2003)

M. paratuberculosis résiste à de nombreux désinfectants mais reste sensible à certains notamment au formol 5%, au Crésyl (dilution 1/32), au phénol (dilution 1/40) (CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984) . M.paratuberculosis est caractérisé comme toutes les Mycobactéries atypiques, par une grande résistance aux antituberculeux classiques, acide para-amino-salicylique, isoniazide, cyclosérine, éthionamide. Il est cependant sensible à certains antibiotiques, tels la streptomycine, la kanamycine et la rifampicine. (BRUGERE-PICOUX J., DOUART A.2000)

2 - EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE :

2.1 - Situation nationale :

Aucune donnée officielle n'est disponible a ce jour concernant la prévalence de la paratuberculose dans les cheptels ovins ; caprins ou bovin dans le territoire national.

2.2 - Situation internationale :

La paratuberculose est une maladie répandue à travers le monde. La prévalence de la maladie a été calculée selon différentes méthodes. La plupart des études concernent le troupeau laitier, peu de données sont disponibles en ce qui concerne le troupeau allaitant.

De 1950 à 1990, la plupart des études de prévalence étaient basées sur des coprocultures ou des analyses de tissus prélevés sur des animaux d'abattoir. Aux USA, ces études ont révélées une prévalence de 10,8% dans le Wisconsin (en 1983), 18% dans le Connecticut (en 1986), 1,6% en Californie

(en 1975). (**RADOSTIS O.et al.2000**) Concernant l'Australie, la prévalence était nulle en 1955 d'après ces études menées en abattoirs. (**KENNEDY D.J., BENEDICTUS G.2001**)

Au Canada, en 1991, *M.paratuberculosis* était isolé chez 5,5% des bovin dépistés à l'abattoir (**KENNEDY D.J., BENEDICTUS G.2001**). Différentes études plus récentes ont par la suite tentées d'évaluer la prévalence au moyen de tests sérologiques. En Belgique, la séroprévalence de troupeau a été estimée à 18% suite à des dépistages sérologiques pratiqués de décembre 1997 à mars 1998 (**BOELAERT F. et al ; 2000**)

Aux Pays Bas, un faible pourcentage de bovins laitiers (de 2,7 à 6,9%) mais un fort pourcentage de troupeaux laitiers (31 à 71%) sont sérologiquement positifs. (NSW Department of Primary industries/agricultory.2006) En Australie, 2% des animaux et 7% des troupeaux étaient sérologiquement positifs entre 1995 et 1997. Cependant, chez 87,5% de ces troupeaux positifs, seulement un animal était détecté (**KENNEDY D.J., BENEDICTUS G.2001**)

Aux Etats-Unis, une étude des troupeaux laitiers menée par le département de l'agriculture en 1996 rapporte qu'au moins un animal est séropositif dans 22% des troupeaux. L'infection est répartie à peu près uniformément au travers les USA mais la prévalence est étroitement associée à la taille du troupeau : au moins 40% des troupeaux de plus de 300 bêtes sont infectés. (**MANNING E.J.B., COLLINS M.T.2001**)

Une étude sérologique en Floride a rapporté une séroprévalence de 8,6% dans le troupeau allaitant et de 17,1% en laitier. (**RADOSTIS O.M. et al ; 2000**)

3 - EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUEANAL :

3.1 - Espèces atteintes :

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* infecte une grande diversité d'espèces animales. Si cette maladie touche plus souvent des ruminants domestiques (particulièrement les bovins, les chèvres et les moutons), *M. paratuberculosis* a également été retrouvé chez des ruminants sauvages en milieu naturel ou en captivité : cerf, chevreuil, daim, lama, buffle, yack, ou chameau [9]. L'infection a pu être reproduite expérimentalement chez les chevaux, volailles et porcs, ainsi que sur les animaux de laboratoire; il semblerait que le germe puisse se multiplier après une inoculation à très forte dose (**DOUART A.2000**)

D'autre part, Grieg et al. en 1997, ont découvert dans le nord de l'Ecosse à proximité de cheptels bovins déclarés infectés de paratuberculose des lapins sauvages porteurs de *M. paratuberculosis* . (**GREIG et al ; 1997**) L'affection a également été rencontrée chez leurs prédateurs (renards et hermines). (**BEARD et al ; 1999**) Ces découvertes semblent indiquer de nouvelles sortes de réservoirs assurant la dissémination des mycobactéries dans le milieu extérieur.

Mycobacterium paratuberculosis a également été isolé chez l'homme, sur des patients atteints de la maladie de Crohn. Cette maladie est une maladie voisine de la maladie de Johne, d'un point de vue clinique (entérite chronique) et d'un point de vue histopathologique (épaississement de la muqueuse iléale avec présence de lésions granulomateuses affectant la

muqueuse et les ganglions adjacents). Aussi une association entre la maladie de Johne et la maladie de Crohn a donc été suggérée (**GHADIALI A.H. et al ; 2004**)

Toutes ces découvertes ont abouti à une hypothèse concernant le rôle étiologique des mycobactéries dans la maladie de Crohn. Si un lien épidémiologique entre les deux maladies se confirmait, on pourrait soupçonner une zoonose : le germe des ruminants pourrait se transmettre à l'homme par l'intermédiaire de vecteurs tels l'eau de boisson ou bien le lait.

A l'heure actuelle, les recherches à ce sujet continuent, de même que la polémique. Cependant les résultats des différentes études sont controversés. L'étiopathogénie de la maladie de Crohn demeure inconnue. Plusieurs agents microbiens tels *Listeria monocytogenes*, des *Bacteroides* ou le virus de la rougeole, sont impliqués dans la pathogénie de la maladie de Crohn, cependant aucun n'est spécifique (**BULOIS Pet al ; 2000**)

3.2 - Sources et matières virulentes :

Les sources de matières virulentes sont représentées par les animaux cliniquement malades ainsi que par les animaux infectés asymptomatiques qui peuvent excréter le bacille déjà une à deux années avant l'apparition des signes cliniques. Ceci est vrai quelque soit l'espèce de l'animal infecté : bovin, petit ruminant domestique, ruminant sauvage, ou encore lapin sauvage et ses prédateurs (**VIALARD J.2002**)

Les matières virulentes sont essentiellement constituées par les fèces, qui contiennent de 10² à 10⁸ germes/g de fèces selon le stade évolutif (plus l'animal est à un stade avancé plus il excrète). La résistance élevée du bacille dans les bouses, comme décrit précédemment, explique le rôle fondamental exercé par les souillures fécales dans la transmission inter animale. (**KENNEDY D.J., BENEDICTUS G.2001**)

Le bacille a également pu être isolé dans le lait et le colostrum. D'après Sweeney, *M. paratuberculosis* est retrouvé dans les échantillons de colostrum de 36% des vaches fortement excrétrices, 9% des échantillons de vaches faiblement excrétrices (**SWEENEY R.W.1996**). *M. paratuberculosis* est également retrouvé dans le sperme ; cependant le taux de germes retrouvés dans le sperme de taureau est insuffisant pour assurer l'infection de la femelle lors de la saillie (**VIALARD J.2002**)

Le transfert d'embryon a également été envisagé comme un moyen possible de transmission de l'infection. Le germe est présent à la surface des embryons issus de mères infectées ou dans leurs sécrétions utérines. D'après Sweeney, l'embryon prélevé sur une vache infectée résulte en théorie en un veau infecté, mais non en pratique. De même, le transfert d'un embryon infecté transmet en théorie l'infection à la receveuse, mais ceci n'est pas observé en pratique. Le risque de contamination des receveuses lors du transfert serait fortement réduit par le lavage des embryons (SWEENEY R.W.1996).

3.3 - Modalités de transmission :

3.3.1 - Transmission horizontale :

La transmission de la paratuberculose se fait essentiellement par voie horizontale, par voie fécale-orale. La contamination se fait ainsi par léchage d'objets inanimés souillés par des fèces d'animaux excréteurs de *M. paratuberculosis* (léchage de bottes, du matériel de distribution de l'alimentation ou encore succion de la mamelle souillée de la mère), ou bien simplement par ingestion d'une alimentation ou d'abreuvement souillés.

Lors de la contamination, l'infection n'est pas systématique : elle dépend de l'âge et de la dose infectante. Les jeunes animaux sont les plus touchés. Le risque d'infection est augmenté chez le veau juste après sa naissance en raison d'une plus grande perméabilité du tube digestif. La résistance augmente avec l'âge de l'animal. D'après Sweeney, les adultes se débarrassent très bien du germe après contamination expérimentale par voie orale et la résistance acquise à l'âge d'un an semble équivalente à celle d'un adulte mature. **(SWEENEY R.W.1996).**

D'autre part, la transmission de la paratuberculose par voie horizontale peut se réaliser également par l'intermédiaire du lait. Les veaux peuvent en effet se contaminer par le colostrum ou le lait directement contaminés de leur mère. Ainsi la transmission du germe à partir de vaches excrétrices asymptomatiques se réalise dès que le nombre de germes est supérieur à 2 pour 50 ml de lait. Par ailleurs, dans l'hypothèse où la paratuberculose bovine serait une zoonose, on pourrait s'interroger sur le risque de transmission du germe à l'humain par simple consommation du lait. En effet différentes études ont démontré que le germe résistait au moins partiellement à la pasteurisation du lait. **(SWEENEY R.W.1996).**

3.3.2 - Transmission verticale :

Une transmission verticale directe est possible in utero en raison des phases de bactériémie de *M. paratuberculosis*. Le risque de contamination fœtale est étroitement lié à la sévérité de l'infection, elle-même mesurée par le nombre d'organismes excrétés dans les fèces. Un niveau d'excrétion d'au moins 3000 germes/g de fèces serait nécessaire pour que la transmission transplacentaire se réalise. Plus le niveau d'excrétion est important, plus le risque de transmission de la maladie au fœtus s'accroît. Ce risque de contamination mèrefoetus conduit à conseiller l'abattage des veaux issus de mères infectés. *M. paratuberculosis* a pu être mis en évidence par culture de tissus fœtaux dans seulement 8,6% des fœtus provenant de vaches infectées asymptomatiques et dans 20 à 40% des fœtus de vaches infectées cliniquement (SWEENEY R.W.1996).

L'hypothèse d'une infection in *utero* induisant un état d'immunotolérance (comme dans la maladie des muqueuses) est même suggérée. L'apparition des signes cliniques surviendrait plus précocement chez ces animaux. Ces derniers ne seraient détectables que par culture fécale (VIALARD J.2002)

La contamination d'un cheptel par *M. paratuberculosis* se réalise essentiellement par voie horizontale et concerne les veaux en période post-natale. L'importance de la transmission verticale est discutée mais l'existence de cette modalité de contamination justifie la réforme de la descendance des vaches infectées (Figure 1).

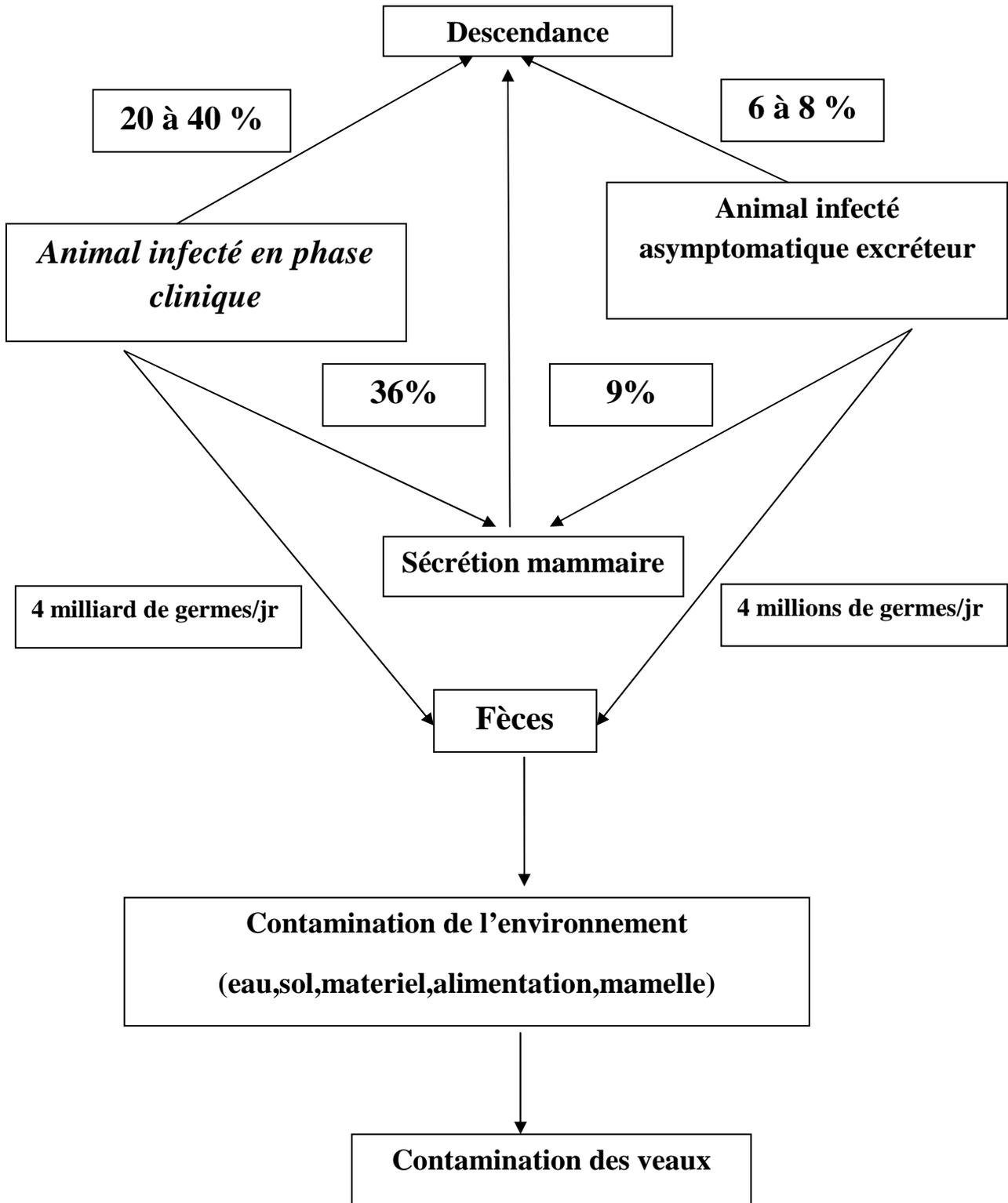


Figure 01: Modalités de la contamination d'un cheptel (d'après Sweeney)
 (SWEENEY R.W.1996).

3.4 - Facteurs de réceptivité et sensibilité :

3.4.1 - Facteurs intrinsèques :

L'espèce : Les ruminants sont majoritairement atteints, qu'ils soient domestiques ou sauvages. La race : La maladie existe en élevage laitier et en élevage allaitant. Les conditions d'élevage et non la race interviennent dans la réceptivité(**CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984**)

L'âge : C'est un facteur très important : la réceptivité est maximale entre 0 et 6 mois en raison de l'immaturation du système immunitaire cellulaire du jeune et des conditions physicochimiques favorables au niveau du tube digestif (pH acide, lactoferrine constituant un apport de fer pour la mycobactérie). D'autre part, la capture de *M. paratuberculosis* par les cellules M des plaques de Peyer par opsonisation serait favorisée par la présence d'anticorps colostraux dirigés contre *M. paratuberculosis*.

La contamination d'un animal adulte est possible mais beaucoup plus rare. Une forte pression d'infection est alors nécessaire. Cependant, l'incubation étant longue et la sensibilité étant plus faible, ces animaux contaminés à l'âge adulte présentent rarement des signes cliniques mais peuvent excréter la bactérie (**VIALARD J.2002**)

L'individu : L'état immunitaire du veau intervient dans la réceptivité de l'animal à la maladie. L'état physiologique joue également un rôle : la vache laitière haute productrice est ainsi un animal typiquement atteint par la paratuberculose du fait de sa plus grande fragilité, notamment lors du pic de lactation (**RADOSTIS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W.2000**)

3.4.2 - Facteurs extrinsèques :

L'alimentation : Outre la quantité de ration distribuée, la qualité est aussi importante : les teneurs en oligo-éléments et en minéraux sont notamment primordiales. Les carences en sélénium, cuivre ou magnésium sont des facteurs d'apparition de diarrhées. Le calcium et le phosphore interviennent dans la prévention de la paratuberculose. (PETIT H., 2006)

Les maladies intercurrentes : Les parasites gastro-intestinaux sont responsables de lésions de la muqueuse, ils facilitent donc la pénétration de la mycobactérie. De plus, toutes les maladies provoquant une diminution de l'immunité (fasciolose, maladie des muqueuses) constituent des facteurs favorisant l'expression clinique de la maladie. (PETIT H., 2006)

Le sol : Un sol acide, humide, décalcifié favorise la survie de *Mycobacterium paratuberculosis*. De plus, la qualité de l'alimentation est étroitement liée à la qualité du sol : un pH trop acide diminue l'assimilation des éléments minéraux par la plante ; le fourrage sera donc de moins bonne qualité. (PETIT H., 2006)

Les conditions d'élevages : Une forte concentration d'animaux et une mauvaise hygiène favoriseront la contamination des jeunes en augmentant la charge infectieuse, de même que l'épandage du fumier contaminé sur les pâtures. (PETIT H., 2006)

4 – Pathogénie

La réponse immunitaire varie selon l'animal mais aussi dans le temps sur un même animal. L'hétérogénéité et la variabilité de la réponse résultent de réactions immunitaires complexes qui dépendent de l'hôte plutôt que du microorganisme infectant, *Mycobacterium paratuberculosis*.

4.1 - Devenir du germe dans l'organisme :

4.1.1 - Portes d'entrées et extension locale :

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis pénètre dans l'organisme dans les conditions naturelles par voie orale. Le site primaire de multiplication se situe dans les tonsilles pharyngiennes. Aucune manifestation clinique ni lésionnelle n'est alors observable. (L'SCHELCHER F., ESPINASSE J., 1990)

L'essentiel de la suite se déroule dans l'intestin grêle : les mycobactéries pénètrent dans la muqueuse digestive où des macrophages, les cellules M, les phagocytent et les transportent de l'épithélium du dôme vers les parties les plus profondes du tissu lymphoïde.

Cependant d'autres routes existent telles la voie transcellulaire et/ou paracellulaire ; Le développement de lésions à l'extérieur de l'iléon dans des sites dépourvus de cellules M (le côlon par exemple) suggère d'ailleurs l'existence de ces autres routes empruntées par *M. paratuberculosis* pour pénétrer et infecter (CHIODINI R.J.1996)

Le bacille est capturé préférentiellement au niveau des structures immunitaires digestives : les plaques de Peyer du jéjunum et de l'iléon. La présence d'anticorps favorise la prise en charge de *M. paratuberculosis* dans les cellules M. C'est ainsi que les anticorps colostraux dirigés contre la

mycobactérie pourraient faciliter la capture du germe par les cellules M par opsonisation. Le processus se poursuit progressivement et localement par contiguïté de façon centrifuge (VIALARD J.2002)

4.1.2 – Bactériémie :

M. paratuberculosis persiste ensuite dans les macrophages. Ces derniers disséminent ainsi le germe en quittant l'intestin et en rejoignant le courant circulatoire : des phénomènes de réinfections endogènes précoces, via le système lymphatique local, le canal thoracique puis la circulation générale et enfin le retour vers la lamina propria, provoquent une réponse immunitaire transitoire à IgM. On retrouve ainsi quelquefois des lésions de microgranulomes dans le foie, les reins, la rate, les poumons en phase terminale d'évolution essentiellement (SCHELCHER F., ESPINASSE J.,1990)

4.2 - Evolution et particularités de la réponse immunitaire :

4.2.1 - La réponse immunitaire non spécifique :

Au début de l'infection, après sa capture par les cellules M, *M. paratuberculosis* est transféré dans des macrophages inactivés. La mycobactérie parvient toutefois à résister à l'activité bactéricide des phagocytes grâce à différents mécanismes :

- la présence de sulfatide dans sa paroi évite la fusion du phagosome avec le lysosome ou protège la bactérie des enzymes lysosomiales ;
- la fraction pariétale phénolglycolipidique ou le lipoarabinomannane de la paroi mycobactérienne protège la bactérie contre les substances oxydantes (VIALARD J. 2002)

Les macrophages non activés ne peuvent pas tuer les bactéries intracellulaires Facultatifs mais fournissent un environnement favorable à leur croissance. La bactérie survit dans le macrophage inactivé et continue de proliférer dans un état de symbiose apparente pendant que les mécanismes T dépendants recrutent les phagocytes mononucléés appropriés sur le site pour l'activation. Le phagocyte infecté nécessite effectivement l'aide d'autres cellules du système immunitaire pour détruire la bactérie intracellulaire (**CHIODINI R.J.1996**)

Dès leur infection par des mycobactéries, les macrophages produisent des Interleukines 12 et 18. Ces cytokines activent les cellules Natural killer (NK) qui constituent la première ligne de défense de l'organisme contre ces mycobactéries. L'interféron gamma produit par ces cellules NK active les macrophages (**STORSET K.A.2003**)

4.2.2 - L'immunité cellulaire :

Certains macrophages parviennent à détruire la mycobactérie. Il s'agit en fait d'une digestion partielle. Les antigènes bactériens sont alors présentés à la surface des macrophages en association avec les antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Les lymphocytes T auxiliaires CD4+ parcourent l'organisme à la recherche de structures protéiques qu'ils reconnaîtraient. Les CD4+ migrent du sang vers les plaques de Peyer où certains reconnaissent l'association et se lient au macrophage. Lorsque le lymphocyte T auxiliaire CD4+ naïf a reconnu sa cible, celui-ci peut évoluer selon deux voies différentes : la voie TH1 (réponse cellulaire) ou la voie TH2 (réponse humorale). (**STORSET K.A.2003**) .Dans le cas d'une infection mycobactérienne, les cytokines produites orientent le CD4+ vers la voie cellulaire. L'interféron gamma (INF γ) constitue la cytokine clef de la réponse TH1. Cette cytokine

stimule les macrophages (ils deviennent ainsi capable de contrôler l'infection mycobactérienne), favorise la réponse TH1 et inhibe l'autre voie, la TH2. Les lymphocytes CD4+ sont les cellules les plus importantes de cette phase précoce de la réponse immunitaire. Dans le cas de la tuberculose, ce sont les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) les plus importantes. (STORSET K.A.2003)

Dans le cas de la paratuberculose, les CD8+ produisent de l'interféron gamma et contribuent ainsi à la réponse TH1. De plus, ils détruisent par leur action cytotoxique les macrophages infectés et les bactéries intracellulaires. Ils peuvent aussi ne détruire que le macrophage, libérant la bactérie intracellulaire qui devient alors disponible pour de nouveaux macrophages activés capables de restreindre la croissance mycobactérienne (STORSET K.A.2003)

Lors de la réponse immune cellulaire, les lymphocytes T activés accumulent et libèrent des lymphokines qui conduisent à la migration et prolifération des macrophages, et à leur différenciation en cellules épithélioïdes puis en cellules géantes dites de Langhans. Il se forme alors des **granulomes**, lésions élémentaires de la paratuberculose, au niveau des plaques de Peyer. Les macrophages au centre du granulome sont plus riches en enzymes lysosomiales et ont une plus grande capacité de destruction (CHIODINI R.J.1996)

Les lymphocytes encerclant les macrophages infectés fournissent des cytokines nécessaires pour contrôler l'infection. Certaines cellules abritant des mycobactéries se disséminent jusqu'au fond des nœuds lymphatiques mésentériques où des lymphocytes T naïfs sont stimulés et deviennent effecteurs. Des lymphocytes T mémoires sont également produits. Ces cellules circulent dans le corps et génèrent une réponse cellulaire rapide contre les mycobactéries (STORSET K.A.2003)

4.2.3 - L'immunité humorale :

Après quelques années, chez un certain nombre d'animaux, de plus en plus de lymphocytes sont orientés vers la voie TH2. La raison de ce changement d'orientation est inconnue. La voie TH2 est caractérisée par la production de cytokines IL4 et IL10. IL4 stimule la voie TH2 et inhibe la voie TH1. IL10 désactive les macrophages.

Les lymphocytes B sont ainsi stimulés par des cytokines, notamment IL4, et évoluent en plasmocytes producteurs d'anticorps. La réponse humorale est ainsi établie. Suite à cette réponse, les cellules infectées ne contrôlent plus la croissance mycobactérienne. La présence de cette immunité humorale implique généralement une augmentation de la prolifération bactérienne et une diminution de la réaction immunitaire à médiation cellulaire. La présence et la quantité d'anticorps sont directement corrélées à la Charge bactérienne dans l'individu (figure 2).

Cependant, l'apparition d'anticorps ne peut pas toujours être relié à la diminution de la réponse cellulaire. Les réponses humorale et cellulaire peuvent coexister en différentes portions de l'intestin : bien que les cytokines de l'une inhibent l'autre voie localement, les deux types de réponses peuvent être retrouvées simultanément dans le courant sanguin.

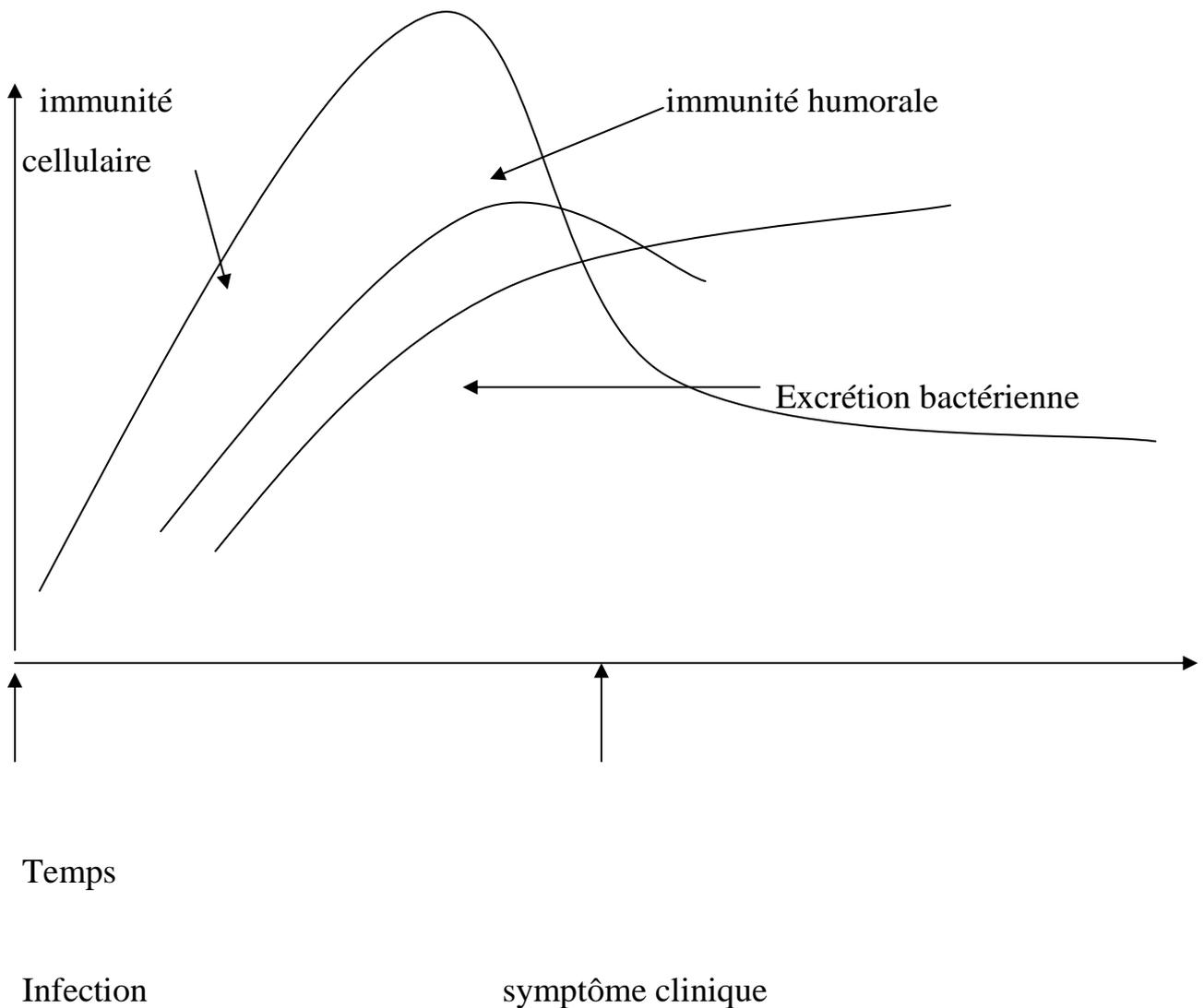
Après cette phase, les plaques de Peyer sont constituées de lésions granulomateuses où les macrophages « encerclent » les bactéries. La plupart du temps, ces lésions granulomateuses se répandent dans tout le reste de l'intestin grêle, le côlon, caecum, et deviennent responsables de la perte de protéines et de la malabsorption (STORSET K.A.2003)

L'immunité contre *M. paratuberculosis* est basée sur une réponse immunitaire à médiation cellulaire. La réponse immunitaire à médiation

humorale n'a que peu ou pas de valeur protectrice. Le développement de l'immunité fait intervenir une coopération entre les lymphocytes T comme inducteurs spécifiques et des macrophages comme cellules effectrices non spécifiques. Les lymphocytes T recrutent et rassemblent les phagocytes mononucléaires pour former un granulome et activer les macrophages pour augmenter l'activité bactéricide. L'interaction entre les cellules est contrôlée par des médiateurs solubles les interleukines, lymphokines et cytokines. (STORSET K.A.2003)

4.2.4 - Variation de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'infection par *M. paratuberculosis* :

La réponse immunitaire vis à vis de *M. paratuberculosis* se réalise en deux temps la première phase est dominée par une réponse cellulaire, la deuxième par une réponse immunitaire humorale (figure 2). Cependant, malgré la capacité des veaux nouveau-nés à développer une réponse immunitaire cellulaire, cette dernière ne peut se dérouler immédiatement. Un laps de temps s'écoule entre l'infection et l'expression de la réponse cellulaire. Cette période correspond à l'expression de l'antigène, la recombinaison des clones des cellules T spécifiques, l'expansion clonale, le recrutement et l'activation des composants cellulaires de la réponse (CHIODINI R.J.1996)



**Figure 2: Variation de la réponse immunitaire en fonction du temps
(CHIODINI R.J.1996)**

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est protectrice mais elle est très variable et modulable : entre la destruction des bacilles infectants et l’extension des mycobactéries à la majeure partie de l’intestin avec apparition des signes cliniques, tous les intermédiaires sont possibles. La réponse immunitaire à médiation humorale est classiquement considérée comme non protectrice. Cette réponse semble évoluer inversement à la réponse cellulaire. Tandis que le niveau d’excrétion fécale augmente

avec le temps, on observe une atténuation de la réaction allergique cutanée, puis sa disparition lors de la phase d'expression clinique de la maladie.

Durant cette phase d'anergie, les mécanismes immunitaires cellulaires s'effondrent, une bactériémie avec diffusion du bacille dans tout l'organisme se produit. Le niveau d'anticorps sous l'effet de cette bactériémie, augmente alors rapidement. La réponse immunitaire peut rester constante ou bien fluctuer au cours du temps. De nombreuses causes sont évoquées pour expliquer les dépressions transitoires ou permanentes des mécanismes de protection : la sensibilité génétique, l'immaturation du système immunitaire, La paratuberculose s'accompagne souvent d'une immunodépression non spécifique ou spécifique. Ceci pourrait expliquer l'association fréquente de cette maladie et de mammites (SCHELCHER F., ESPINASSE J., 1990)

5- Impact économique :

Plusieurs études sur les pertes économiques dues à la paratuberculose ont été menées dans différents pays concernés. Cependant, plusieurs facteurs rendent ces études difficiles. (LAWRENCE J., HUTCHINSON J.1996)

Tout d'abord, les pertes économiques sont sous-estimées du fait de la phase subclinique prolongée de la maladie durant laquelle les animaux sont mal détectés. De plus, les pertes sont estimées d'après un niveau initial de production. Or ce niveau varie en fonction des régions, des élevages. (LAWRENCE J., HUTCHINSON J.1996)

5.1 - En troupeau laitier

Dans les troupeaux laitiers, la paratuberculose induit des baisses de production laitière, une plus courte espérance de vie, une diminution de fertilité, une augmentation des intervalles entre vêlages. (**LAWRENCE J., HUTCHINSON J.1996**)

5.1.1 - Les effets sur la production

Plusieurs études ont été menées afin de quantifier les pertes de production de lait chez les animaux infectés cliniques et subcliniques.

Aux Etats-Unis, 1978, une réduction de la production laitière de 16% pour les animaux infectés cliniques et de 6% pour les animaux infectés subcliniques lors de leur dernière année de lactation avant la réforme en comparaison avec la production prévue, a été enregistrée. De même, d'après une étude en Nouvelle-Zélande portant sur six troupeaux infectés, la production laitière de bovins à coproculture positive serait de 17% plus faible que pour les bovins à coproculture négative (**LAWRENCE J., HUTCHINSON J.1996**)

5.1.2 - Les effets sur la santé et la reproduction

La paratuberculose a souvent été associée à une réduction des performances de reproduction et une augmentation de l'incidence des mammites. Dans les troupeaux infectés par *Mycobacterium paratuberculosis* étudiés par **Merkal et al.** (cités par **Lawrence et Hutchinson 1996**), seuls 30% des animaux infectés ont été réformés pour motif de paratuberculose clinique, 15,9% pour mammites, 37,3% pour infertilité et 16,9% pour motifs divers. L'intervalle entre vêlages dans un troupeau de Californie étudié par Abbas et al. (Cités par **Lawrence et Hutchinson 1996**) était de 15,18 mois pour les bovins

infectés par la paratuberculose, contre 13,45 mois pour les autres animaux non infectés.

Toutefois, l'évidence de l'influence de la paratuberculose sur la santé et la reproduction est controversée. Une étude réalisée en Nouvelle Zélande sur six troupeaux infectés par la paratuberculose, n'a montré aucune relation évidente entre les bovins positifs à la coproculture et une plus grande fréquence de mammites ou d'infertilité.

Ces divergences peuvent être en rapport avec la sensibilité des tests diagnostics ou à la différence de stade ou de sévérité de l'infection des animaux testés positifs.

5.1.3 - Effets sur l'état corporel et les réformes

Les bovins infectés sont réformés plus tôt que les autres animaux du troupeau soit parce que le troupeau fait l'objet d'un programme d'éradication, soit parce que les animaux infectés sont moins productifs, et/ou ont d'autres maladies intercurrentes.

Dans une étude en Pennsylvanie portant sur des bovins laitiers réformés sélectionnés au hasard, **Whitlock et al.** (Cités par **Lawrence et Hutchinson 1996**) ont rapporté que les bovins positifs en coproculture pesaient 129 livres de moins que les animaux négatifs lors de l'abattage, soit une perte de 48\$ par tête sur le prix d'un bovin en 1984 lors de l'étude. Pour une prévalence de 7% de bovins laitiers ayant la paratuberculose lors de la réforme, les pertes économiques dues aux pertes de poids ont été estimées à 648 000\$ par an en 1984 pour la Pennsylvanie.

Lors d'une étude sur un troupeau infecté, Buergelt et Dunkan (cités par **Lawrence et Hutchinson 1996**) ont rapporté que l'âge moyen des bovins réformés était de 7,7 ans chez les bovins non infectés, 4,9 chez les infectés sans signe clinique et 4,3 chez les bovins infectés avec signes cliniques. De même, d'après **Wilson et al.** (Cités par **Lawrence et Hutchinson 1996**), le taux de réforme dans un troupeau Holstein de 210 têtes était six fois plus grand parmi les bovins infectés que chez les bovins non infectés ; malgré une politique de réforme dans cet élevage non basée sur le statut en paratuberculose.

Les réformes prématurées des animaux infectés résultent en une perte de matériel génétique potentiellement de valeur, réduit le nombre de réformes volontaires ou associées à la production, et une augmentation des coûts pour l'achat des animaux de remplacement. Les propriétaires de troupeaux infectés reconnaissent que l'accélération du taux de renouvellement est un des principaux fardeaux de cette maladie.

5.2 - En troupeau allaitant

Très peu de données sont disponibles en ce qui concerne les pertes économiques provoquées par la paratuberculose dans un troupeau allaitant. Cependant, la réduction de production laitière réduit le taux de croissance des veaux. De plus, on peut supposer que les pertes sont plus importantes en allaitant qu'en laitier dans la mesure où les vaches allaitantes ont une plus longue « carrière ». Le pic d'incidence de cas cliniques se situe à un âge de trois à cinq ans. Les animaux infectés seront donc réformés alors qu'ils n'auront exploité qu'environ un cinquième de leur potentiel. (**LAWRENCE J., HUTCHINSON J.1996**)

CHAPITRE II :
DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE CHEZ
LES RUMINAUX ET MOYENS DE LUTTE

La paratuberculose est une maladie grave qui implique de lourdes conséquences. L'élaboration de plans de lutte est indispensable mais nécessite une bonne connaissance des différents outils diagnostics existants, traitements ainsi que des méthodes de prophylaxie.

1- Diagnostic clinique :

1.1 – Symptômes :

La paratuberculose ou maladie de Johne est une affection digestive caractérisée cliniquement par l'apparition d'une diarrhée intermittente dans les premiers temps devenant ensuite incoercible et d'un amaigrissement progressif malgré un appétit conservé. (**Whitlock et Buergelt 1996**),

On considère 4 stades dans la maladie. Ces stades diffèrent les uns des autres selon la sévérité des signes cliniques, le potentiel de propagation de *M. paratuberculosis* dans l'environnement, et l'aisance avec laquelle la maladie peut être détectée en utilisant les méthodes de diagnostic courantes de laboratoire. Selon (**Whitlock et Buergelt 1996**), les animaux cliniquement malades dans un élevage représentent la partie émergée d'un iceberg : lorsqu'un cas clinique de paratuberculose à stade avancé est détecté dans une ferme, il est vraisemblable selon les auteurs que 25 autres animaux sont aussi infectés, selon la répartition suivante (Figure 3) :

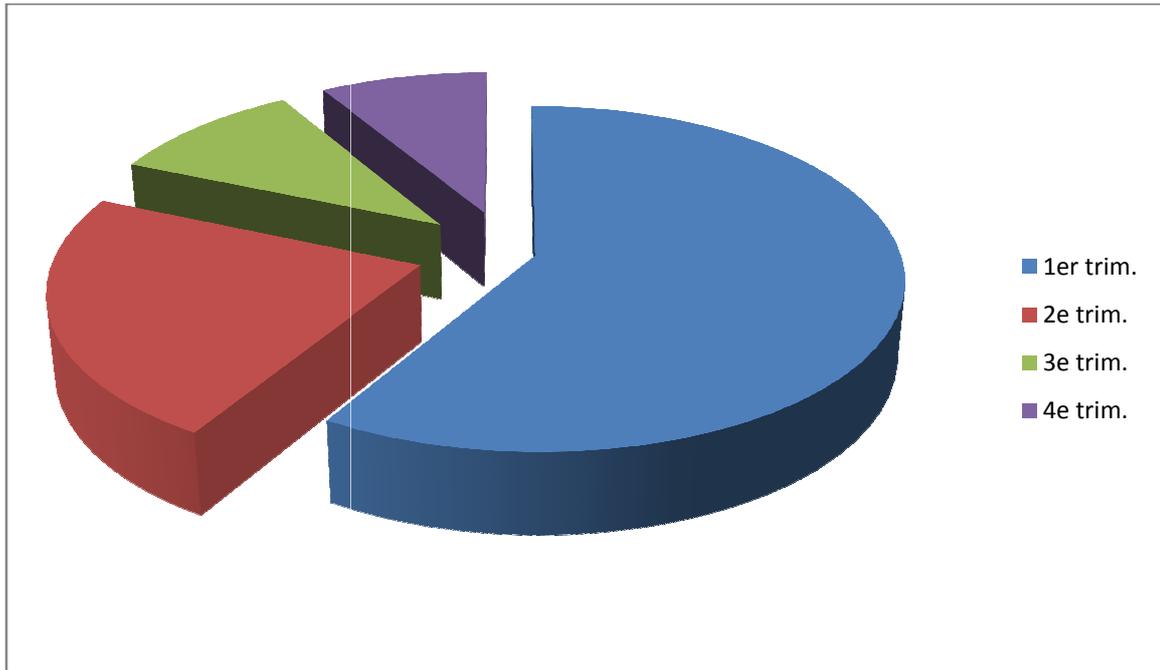


Figure 3: Répartition des animaux infectés en fonction du stade d'infection (Whitlock et Buergelt 1996),

Cette notion d'« iceberg » est importante dans la mesure où les animaux au stade 1 et 2 sont infectés mais sont très difficiles à détecter alors qu'ils constituent une menace pour les animaux non infectés du troupeau et peuvent pérenniser l'infection au sein du cheptel (**BRUGERE-PICOUX J., DOUART A.2000**)

1.1.1 - Stade 1 : Infection silencieuse :

Après que les jeunes animaux ont été contaminés, l'infection reste inapparente : ces animaux infectés ne présentent aucun des signes cliniques caractéristiques de la maladie.

Aucune différence significative ne peut être notée entre animaux infectés et non infectés en ce qui concerne leur croissance, leur gain de poids quotidiens et leur apparence (**Whitlock et Buergelt 1996**),

La durée d'incubation peut varier selon différents facteurs liés aux conditions d'élevage : la quantité de germes ingérés lors de la contamination, l'âge au moment de cette contamination, le statut immunitaire de l'animal, l'alimentation...La période d'incubation peut durer au minimum 6 mois ou au maximum 15 ans ; cependant dans la plupart des cas la maladie se déclare à un âge compris entre 2 et 7 ans (**CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984**).

Ces animaux n'excrètent pas ou peu (à un niveau en dessous du seuil de détectabilité) Le bacille dans l'environnement. La seule façon efficace de détecter les animaux infectés à ce stade précoce, est de démontrer la présence de l'organisme dans le tissu, par culture ou par Recherche histologique de micro granulomes dans l'intestin et/ou les nœuds lymphatiques (**Whitlock et Buergelt 1996**),

1.1.2 - Stade 2 : Maladie subclinique :

A ce stade, les animaux n'ont toujours ni diarrhée, ni autres signes cliniques typiques de la maladie de Johne. Cependant ils présentent des anticorps dirigés contre *M. paratuberculosis* détectables et une réponse immunitaire cellulaire altérée. Ces animaux sont prédisposés à d'autres maladies, telles l'infertilité et les mammites. Seul un petit pourcentage de ces animaux infectés (15-25%) peut être détecté lors d'examen de laboratoire tel que la culture fécale. Néanmoins, ils excrètent l'organisme dans leurs fèces et constituent une menace pour les autres animaux non infectés de la ferme. Ces animaux vont progressivement évoluer vers le stade 3 de la maladie. La plupart ne sont pas détectés par leur propriétaire ou leur vétérinaire. Les dimensions de la base de l'iceberg sont ainsi difficiles à apprécier pleinement (**Whitlock et Buergelt 1996**),

1.1.3 - Stade 3 : Affection clinique :

Après une longue période d'incubation, les symptômes apparaissent. L'animal perd du poids malgré un appétit conservé. La production de lait diminue. En parallèle, les fèces deviennent liquides. Cette diarrhée peut être intermittente au début mais finit par devenir incoercible. Les signes vitaux, à savoir les fréquences cardiaque et respiratoire, ainsi que la température, restent normaux. Le poil devient terne, sec, piqué et décoloré. Cette décoloration correspond à une dérivation compensatoire du précurseur de la vitamine A (carotène) de la peau vers d'autres besoins métaboliques (**Whitlock et Buergelt 1996**),

En général, l'animal progresse en trois ou quatre mois vers le stade 4. Cependant, il peut arriver dans certains cas inhabituels que les signes cliniques rétrocedent et que l'animal régresse vers le stade 2, ceci pour une période indéterminée. La diarrhée diminue souvent pendant la gestation, mais reprend plus sévèrement suite à la parturition. (**CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984**)

D'un point de vue biochimique, certains changements s'opèrent. Ces derniers sont prévisibles et caractéristiques de ce stade clinique mais ne sont pas assez spécifiques pour être utilisés comme test diagnostique de la maladie de Johne les taux plasmatiques de protéines totales, albumine, triglycérides et cholestérol du plasma diminuent à mesure que la maladie progresse. Les taux plasmatiques des enzymes musculaires (créatine kinase et aldolase) augmentent mais ceci résulte très certainement de l'atrophie des masses musculaires. La plupart de ces animaux sont retrouvés positifs par une culture fécale. Leur taux d'anticorps dirigés contre *M. paratuberculosis* augmente et ils deviennent détectables par le test ELISA (**Whitlock et Buergelt 1996**),

1.1.4 - Stade 4 : Affection clinique en fin d'évolution :

La maladie progresse : les animaux deviennent léthargiques, émaciés. La diarrhée s'intensifie, sans signe de douleur abdominale. Des oedèmes typiques (signe de la bouteille) apparaissent en raison d'une hypoprotéïnémie. La cachexie et la diarrhée aqueuse caractérisent ce stade terminal de la maladie. Les conditions de l'animal se détériorent très rapidement, souvent en quelques jours. Si l'animal n'est pas abattu avant, la mort survient suite à une déshydratation intense et à la cachexie. Les animaux peuvent passer du stade 2 à 4 en quelques semaines (**Whitlock et Buergelt 1996**),

1.2 - Les lésions anatomie-histopathologique :

L'intensité des symptômes peut ne pas refléter fidèlement de la sévérité des lésions.

1.2.1 - Lésions macroscopiques :

A l'examen nécropsique, l'animal est émacié, présente une sérieuse atrophie des masses adipeuses, des oedèmes, et des épanchements séreux dans les cavités corporelles. Les lésions sont principalement confinées au tractus intestinal et aux nœuds lymphatiques correspondants. L'intestin semble plissé et oedémateux, cette apparence en tôle ondulée (aspect encéphaloïde) ne disparaît pas à la traction. La muqueuse peut être rougie par la congestion ou ulcérée entre les plis. Dans les cas sévères, la muqueuse intestinale peut paraître granuleuse, opaque. La paratuberculose est aussi appelée pour cette raison « la maladie du boyau blanc ». Les lésions peuvent être segmentées ou diffuses. On trouve ces lésions du duodénum au rectum mais elles sont plus prononcées dans

la partie terminale de l'iléon, au niveau de la valvule iléocaecale. Les nœuds lymphatiques mésentériques sont hypertrophiés, œdémateux, pâles. Les nœuds associés à la région iléo-caecale sont les plus sévèrement touchés. Les vaisseaux lymphatiques sont également épaissis le long de leur trajet dans le mésentère, ils forment des « cordons ». (CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984)

D'autres organes peuvent être touchés : le foie est le plus souvent affecté, mais il ne présente que des granulomes focaux très difficiles à observer lors d'une inspection. (CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984)

1.2.2 - Lésions microscopiques :

Les lésions microscopiques sont caractérisées par une réaction inflammatoire de type granulomateux. Deux types lésionnels existent : la forme tuberculoïde (nodulaire) et la forme lépromateuse (diffuse). Ces deux formes se succèdent dans le temps. Les lésions de type tuberculoïde apparaissent en premier. Elles sont liées à la réponse immunitaire à médiation cellulaire. La lamina propria de la muqueuse intestinale présente de nombreux microgranulomes principalement au niveau de l'iléon, parfois le caecum, le colon et le rectum. Les granulomes contiennent des macrophages de type épithélioïde riches en bacilles alcool-acido-résistants et des cellules géantes de Langhans. Les macrophages infiltrent et épaississent la sous muqueuse, mais n'atteignent habituellement pas la musculature. Suite au stade tuberculoïde, apparaît le stade lépromateux correspondant à la diminution de la réaction immunitaire à médiation cellulaire et à l'apparition de la réponse humorale. Les lésions précoces tuberculoïdes et multifocales progressent pour finir par se coalescer, comprimer ou oblitérer les cryptes intestinales. Le sommet des villosités fusionne souvent provoquant une diminution de la surface d'absorption. Cette réduction d'absorption des nutriments conduit à une perte de

poids ; l'entérite granulomateuse résulte en une perte de protéines, l'hypoprotéinémie se manifestant cliniquement par des oedèmes.

(**CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984**)

Les nœuds lymphatiques sont également infiltrés et contiennent des macrophages, des cellules géantes de Langhans, des bacilles. Le foie présente aussi des granulomes focaux avec des cellules géantes de Langhans, mais les bacilles sont habituellement absents de cet organe.

Des lésions d'artérioscléroses peuvent être observées dans des cas avancés au niveau de l'aorte et du cœur. (**CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S.1984**)

Dans un élevage donné, la paratuberculose peut exister depuis plusieurs années ou au contraire apparaître sans que rien ne permette à l'éleveur de la soupçonner à priori. L'éleveur consultant aura le plus souvent tenté un ou plusieurs traitements (souvent antiparasitaires) avant d'appeler le praticien. Les critères de suspicion sont les suivants: bovins de plus de deux ans, diarrhée, absence de température, appétit conservé. . (**SANCHEZ J.1998**)

2- Diagnostic de laboratoire :

Différentes méthodes de diagnostic sont couramment employées. Le diagnostic de la paratuberculose peut être réalisé selon deux principes de base :

- Le diagnostic direct : mise en évidence de l'agent causal, c'est-à-dire *Mycobacterium paratuberculosis* ;
- Le diagnostic indirect : mise en évidence de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'infection (cytokines, anticorps, ou lésions). . (**SANCHEZ J.1998**)

2.1 - Les Tests de diagnostic direct :

2.1.1 - La bactérioscopie :

Dans les laboratoires vétérinaires, la méthode de bactérioscopie utilisée est la coloration de Ziehl-Neelsen. Cette technique s'appuie sur la résistance à la décoloration par l'acide et l'alcool des germes mycobactériens après coloration à la fuschine. Les mycobactéries, en raison de leur paroi cellulaire, sont résistantes à cette décoloration. . (SANCHEZ J.1998)

La bactérioscopie peut être faite soit à partir de matières fécales soit à partir de tissus (valvule iléocæcale ou nœuds lymphatiques). Le résultat obtenu est uniquement qualitatif. La limite de détection du germe dans un prélèvement est de 10⁶ germes/g. Les germes sont répartis en amas. (SANCHEZ J.1998)

Le test est rapide, très simple et peu cher.

Ce test présente un manque de sensibilité : d'après **Perard 1988** le taux de faux négatifs serait de 75%. La sensibilité dépend du prélèvement : en cas de diarrhée profuse, la concentration de germes diminue et donc le taux de faux négatifs augmente. De plus les animaux excréteurs asymptomatiques (stades 1 et 2) ont un taux d'excrétion inférieur au seuil de détectabilité et ne sont donc pas détectés. Ce test ne doit donc pas être utilisé pour dépister des animaux asymptomatiques. Cependant, la sensibilité du test est meilleure lorsqu'il est pratiqué sur un animal aux stades 3 ou 4, puisque dans ces cas, le taux d'excrétion est bien supérieur (**PERARD F.1988**)

Le test manque également de spécificité : les résultats faussement positifs s'expliquent par l'impossibilité de distinguer *Mycobacterium paratuberculosis* d'autres mycobactéries présentes dans le prélèvement (**PERARD F.1988**)

2.1.2 - La culture :

La culture est la méthode de diagnostic de référence. Elle est encore largement employée dans les plans de lutte. La culture est réalisée le plus souvent à partir de fèces (coproculture) mais elle peut aussi l'être à partir de tissus (intestin et nœuds lymphatiques). Malgré son utilisation courante, les techniques de culture ne sont pas standardisées et diffèrent selon les laboratoires. Les techniques pour inhiber sélectivement la microflore non mycobactérienne (décontamination) et celles pour concentrer sélectivement *M. paratuberculosis* peuvent varier selon le laboratoire or elles influencent la sensibilité du test.

En France, la norme AFNOR assure une homogénéité de techniques des laboratoires français. (SELVIALARD J.2002) on cette norme, la décontamination est assurée par le chlorure de cétylpyridinium à 0,75%, qui est reconnu comme le décontaminant le moins préjudiciable pour *M. paratuberculosis* et le plus efficace pour tuer les autres organismes. Ensuite l'ensemencement est réalisé sur plusieurs tubes d'un milieu de culture spécifique, le milieu d'Herrold additionné ou non de mycobactine. 8 à 12 semaines sont nécessaires pour que les premières colonies apparaissent, mais le résultat définitif est rendu après 18 semaines. Quelques critères permettent de différencier *Mycobacterium paratuberculosis* d'autres organismes : la croissance lente, la morphologie des colonies, le caractère alcool-acido-résistant des germes et la dépendance vis-à-vis de la mycobactine.

1-Cette méthode aurait une spécificité proche de 100% d'après (Chiodini *et al* 1984). Ainsi, l'isolement de *M. paratuberculosis* dans les fèces d'un animal permet de poser un diagnostic sûr de la paratuberculose. Il existe cependant une exception : si la charge de *M. paratuberculosis* dans l'environnement est

extrêmement forte, l'animal peut ingérer un inoculum d'organismes suffisamment grand pour permettre sa détection dans les prélèvements de fèces sans qu'il y ait eu répliation de la mycobactérie dans l'animal. (COLLINS M.T., 1996)

D'autre part, il existe d'autres mycobactéries mycobactine-dépendantes mais ce phénomène serait très limité. (SOCKETT D.C., CARR D.J., COLLINS M.T.1992)

2-Les résultats de la culture fécale peuvent être exprimés de manière quantitative (négatif ou positif) ou semi-quantitative. Ceci permet de classer les animaux selon leur niveau d'excrétion et ainsi de définir les animaux à réformer en priorité. (VIALARD J.2002)

Le plus grand inconvénient est la lenteur de la détection. Cependant une méthode de culture radiométrique fécale permettrait de réduire le temps de détection à 4 à 7 semaines : cette méthode mesure l'activité métabolique des cultures de bactéries par le marquage radioactif des nutriments présents dans le milieu de culture. Ainsi, les bactéries sont détectées par les rejets gazeux de carbone radioactif, témoin de l'activité métabolique microbienne, avant même que les colonies soient visualisables sur le milieu de culture. (SOCKETT D.C., CARR D.J., COLLINS M.T.1992)

Le deuxième inconvénient de la culture est qu'elle ne permet de détecter que les animaux ayant une infection évidente, c'est-à-dire ceux excréant l'organisme. D'après Collins (1996), approximativement la moitié des animaux infectés par *M. paratuberculosis* sont détectés dans une population de bovins naturellement infectés, soit une sensibilité de seulement 50%. Ces erreurs par défaut peuvent être dues à une hétérogénéité de la répartition des bacilles dans les fèces (la culture fécale est réalisé sur 1 gramme environ or les mycobactéries

sont généralement groupées en amas), à l'intermittence de l'excrétion, au faible niveau d'excrétion (inférieur au seuil de sensibilité de la méthode (10^2 germes/g)). (COLLINS M.T., 1996)

2.1.3 - La PCR (Polymérase Chain Réaction) :

La PCR est une troisième technique de mise en évidence directe de la présence de *Mycobacterium paratuberculosis* dans différents prélèvements (matières fécales et autres tissus tels que l'intestin et les nœuds lymphatiques). Cette technique consiste à amplifier l'ADN de la mycobactérie puis de détecter un fragment de cet ADN spécifique à la mycobactérie grâce à une sonde. IS900 est un élément génétique spécifique à *Mycobacterium paratuberculosis*. Cette insertion est ainsi utilisée couramment comme sonde génétique pour l'identification de cette mycobactérie. Un kit de diagnostic a été commercialisé. Il existe d'autres sondes génétiques, mais l'insertion IS900 est la plus utilisée actuellement (COLLINS M.T., 1996)

Le plus gros avantage de cette technique de diagnostic est sa rapidité. En effet, trois jours seulement sont nécessaires pour obtenir les résultats. Bien sur, les tests sérologiques sont plus rapides. Mais ce test offre les mêmes performances que la coproculture (spécificité d'environ 100%) qui nécessite bien plus de délai (12 à 16 semaines) (VIALARD J.2002)

La sensibilité de ce test est plus faible que celle de la coproculture. En effet, sa limite de détection est plus élevée (10^4 bactéries par gramme). Des faux négatifs peuvent apparaître suite à la présence dans les matières fécales d'inhibiteurs de la Taq polymérase qui intervient dans l'amplification. Enfin ce test est assez cher (20 à 30 euros) (VIALARD J.2002)

2.2 - Les tests de diagnostic indirect :

2.2.1 - Exploration de la réponse immunitaire cellulaire :

Cette méthode met en évidence une sensibilisation de l'animal à un premier contact avec des extraits antigéniques de *Mycobacterium paratuberculosis*, qui se traduit par la réaction d'hypersensibilité retardée de type IV. La réaction immunitaire cellulaire est ainsi mesurée par l'injection intradermique d'extraits mycobactériens avec recherche trois jours plus tard d'une réaction d'inflammation au lieu de l'injection. (SANCHEZ J.1998)

Le test serait plus sensible si l'on injectait des extraits de *Mycobacterium paratuberculosis* (Johnine). Le test est réalisé en effectuant une intradermoréaction comparative entre les tuberculines aviaire et bovine. En effet, *Mycobacterium paratuberculosis* et *Mycobacterium avium intracellulare* ont une parenté génique et antigénique et ainsi on a pu mettre en évidence une réaction positive d'hypersensibilité des animaux porteurs de M.p aux extraits protéiques de *Mycobacterium avium* (tuberculine aviaire). Du fait du manque de spécificité de cette réaction d'hypersensibilité, les animaux tuberculeux réagissent à la tuberculine bovine ainsi qu'à la tuberculine aviaire mais avec une intensité différente. Ainsi, l'animal paratuberculeux, réagit aux tuberculines aviaire et bovine mais l'intensité de la réaction cutanée est différente : la réaction est plus volumineuse vis-à-vis de la tuberculine aviaire que vis-à-vis de la tuberculine bovine en raison de la plus grande parenté antigénique entre *Mycobacterium paratuberculosis* et *avium*. Une intradermoréaction comparative à la tuberculine aviaire et bovine est donc réalisée afin d'éviter que l'identification des bovins porteurs de la paratuberculose n'interfère avec la prophylaxie sanitaire appliquée dans le contrôle et l'éradication de la

tuberculose bovine. Les deux tuberculines sont donc injectées simultanément en deux points distincts au niveau de l'encolure à raison de 1 ml en intradermique.

(SANCHEZ J.1998)

L'intradermoréaction comparative permet le dépistage précoce des animaux infectés. En effet, l'apparition de la sensibilisation de l'animal à l'agent paratuberculeux est plus précoce que l'excrétion du bacille et que la formation d'anticorps témoins de l'infection. Ce test permet donc de dépister les animaux infectés plus précocement (stade 1 à 2) que par coproculture ou sérologie.

La spécificité de ce test est médiocre en raison des réactions croisées. Il faut donc interpréter ces tests allergiques en tenant compte du contexte épidémiologique ainsi que du statut de l'élevage auquel appartient l'animal testé. De plus, il existe une phase d'anergie responsable de l'apparition de faux négatifs sur des animaux en phase clinique. En effet, tandis que le niveau d'excrétion fécale augmente avec le temps, la réaction allergique cutanée s'atténue pour disparaître lors de la phase d'expression clinique de la maladie. Durant cette phase d'anergie, les mécanismes d'immunité cellulaire s'effondrent. Pour ses deux raisons, le test d'intradermoréaction comparative ne peut pas être utilisé comme un test diagnostique. (SANCHEZ J.1998)

Les tests d'intradermoréaction sont en train d'être remplacés par des tests de détection de cytokines in vitro. Le premier test de détection de cytokines pour le diagnostic de la paratuberculose a été développé par Paul Wood au Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) en Australie. Ces tests utilisent un extrait de *Mycobacterium avium* comme antigène stimulant (considéré comme similaire à M.p comme antigène) puis le relargage d'interférons gamma est détecté ; ce qui permet de mesurer la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Le test a été agréé par le laboratoire IDEXX, Inc, Westbrook, ME et est commercialement utilisable mais n'est pas

disponible en France. Peu d'études sur la précision de ce test ont été publiées, la meilleure méthode pour interpréter les résultats est encore en discussion. Néanmoins les rapports sur les résultats semblent assez encourageants. (SANCHEZ J.1998)

Les animaux infectés par *M.p* sont positifs avec ce test avant de l'être par coproculture ou sérologie. Pour l'instant, le test est difficile à réaliser d'un point de vue logistique (le test doit être réalisé sur du sang hépariné frais dans les 16 heures suivant le prélèvement), mais il pourrait être plus utilisé dans le futur, particulièrement pour détecter les jeunes animaux en stade précoce d'infection qui ne sont donc pas encore détectable par les autres méthodes de diagnostic (COLLINS M.T., 1996)

2.2.2 - Détection de la réponse immunitaire humorale:

Les anticorps contre *Mycobacterium paratuberculosis* peuvent être détectés dans le sérum des animaux infectés par une variété de techniques : le test de fixation du complément, le test de précipitation en milieu gélifié et le test ELISA. Ce dernier test qui est un test immuno-enzymatique réalisable sur le sang, est la seule technique sérologique réalisable en routine.

La réponse humorale semble être tardive, mais tout de même avant l'apparition des signes cliniques. Ainsi la pathogénie de la paratuberculose limite quelque peu la capacité des tests sérologiques à détecter les animaux à des stades précoces. Il n'est donc pas conseillé de réaliser l'analyse sur des animaux âgés de moins de 15-18 mois, sinon, les anticorps ne seront pas détectés (COLLINS M.T., 1996)

Sweeney *et al* ont démontré que la sensibilité du kit commercial ELISA pour la paratuberculose bovine est affectée par le stade de l'infection. Ils ont montré que la sensibilité de l'ELISA est de seulement 15% dans des cas de très faible excrétion fécale (stade 1 et 2); tandis qu'elle est de 87% dans le cas d'animaux présentant des signes cliniques de la paratuberculose (stade 3 et 4). En moyenne la sensibilité de ce test est d'environ 50%. (SWEENEY R.W *et al* ; 1995)

Dans le passé, les tests utilisaient des antigènes bruts ainsi que des anticorps non spécifiques ; les réactions croisées ne pouvaient donc pas être évitées. Aujourd'hui, grâce à des techniques plus avancées, les échantillons sont prétraités avec une suspension de *Mycobacterium phlei*. Ceci permet d'éliminer la plus part des anticorps non spécifiques communs à *M. paratuberculosis* et des bacilles phylogénétiquement proches. Dans ces conditions, la spécificité du test est estimée à 99% (COLLINS M.T., 1996)

D'autre part, les résultats de l'ELISA sont quantitatifs. En reportant les résultats positifs/négatifs dans une classification, on obtient des informations permettant de donner une valeur numérique reflétant le niveau d'anticorps détectés. Le taux d'anticorps augmente en même temps que l'infection progresse, les hauts niveaux d'anticorps sont donc corrélés à un délai plus court avant l'apparition des signes cliniques. Les résultats quantitatifs de l'ELISA peuvent donc être utilisés pour savoir quels animaux doivent être réformés en priorité. Les résultats de l'ELISA sur une échelle continue permettent de classer « suspects » les animaux avec des valeurs en dessous du seuil de positivité mais au dessus du seuil de négativité. De tels animaux ont une haute probabilité d'être infectés par *M. paratuberculosis* et sont de bons candidats à un nouveau test. Les tests ELISA pourraient potentiellement être adaptés à la détection des anticorps présents dans le lait. Mais une étude a démontré que l'ELISA dans un échantillon de lait n'a pas les mêmes résultats que ceux d'un ELISA sur

échantillons de sérum sur le même animal. L'ELISA n'est donc utilisé que sur des échantillons de sérums (COLLINS M.T., 1996)

3 - Utilisation recommandée des tests selon la situation :

3.1 - Confirmation d'un diagnostic clinique :

Le plus rapide, précis, et le moins cher des tests pour confirmer un diagnostic clinique de la paratuberculose chez les bovins est l'ELISA. Plus de 85% des bovins infectés par *M. paratuberculosis* avec une diarrhée et une perte de poids sont positifs à l'ELISA, et les résultats faux positifs sont rares. Etant donné que certains animaux ne sont pas séropositifs même à des stades tardifs de l'infection, il est prudent de réaliser un prélèvement fécal afin de réaliser une coproculture chez des animaux négatifs à l'ELISA mais qui ont des signes cliniques. (COLLINS M.T., 1996)

3.2 - Confirmation de résultats positifs :

En dehors de tout contexte de paratuberculose (aucun cas clinique dans le troupeau, ni symptôme chez l'animal concerné), un seul résultat positif ne peut suffire à poser le diagnostic de paratuberculose. Ce résultat doit être confirmé par un autre test de dépistage. (COLLINS M.T., 1996)

3.3 - Estimation de la prévalence de la paratuberculose dans un troupeau :

Le moyen le plus rapide et le plus facile pour mesurer la prévalence de la paratuberculose consiste à pratiquer un test ELISA sur tous les animaux du troupeau ayant plus de deux ans. Le pourcentage de résultats positifs à l'ELISA dans un troupeau (prévalence apparente) doit être doublé pour donner une estimation de la prévalence réelle de la paratuberculose (la sensibilité de ce test est de 50%, donc seule la moitié des animaux infectés est détectée). L'estimation de la prévalence de la paratuberculose dans un troupeau n'est possible que si le troupeau n'a jamais été testé et que les animaux testés positifs ne sont pas réformés. Dans le cas contraire, cette prévalence serait sous-estimée. (COLLINS M.T., 1996)

3.4 - Maîtrise de la paratuberculose :

La réforme des animaux testés positifs doit faire partie de tous les programmes de maîtrise de la paratuberculose. La fréquence des tests et le nombre de tests différents utilisés sont gouvernés par plusieurs facteurs : le type d'atelier auquel les animaux appartiennent, la prévalence estimée de la paratuberculose, la perception du propriétaire vis-à-vis de l'importance de la maladie sur la productivité du troupeau, la capacité de l'éleveur à pouvoir payer les tests, le temps que l'éleveur veut mettre pour achever la démarche de contrôle de la paratuberculose, et le but de l'éleveur qui peut être d'éradiquer ou de contrôler la maladie. Pour la plupart des troupeaux laitiers, un ELISA de troupeau est la première étape. (COLLINS M.T., 1996)

Après que les animaux testés positifs aient été réformés, dans les 12 mois suivants, un deuxième test doit être fait sur le troupeau entier. Pour ce second test, l'ELISA peut être de nouveau utilisé ou bien une culture fécale peut être

réalisée à la place. L'ELISA est moins cher, mais la culture fécale permet de détecter les animaux non décelés par l'ELISA. (COLLINS M.T., 1996)

3.5 - Tests d'achat :

Les troupeaux s'infectent par l'introduction d'animaux infectés asymptomatiques. La biosécurité est d'une importance capitale dans la prévention de la paratuberculose. Bien que le meilleur moyen de rester indemne de paratuberculose soit de rester en troupeau fermé, la plupart des propriétaires d'animaux achètent occasionnellement ou louent des animaux et mélangent ceux-ci au troupeau résident. Avec l'introduction de ces animaux, les propriétaires courent un risque mesurable d'introduire *M. paratuberculosis*. Aux USA, pour un bovin acheté, le risque serait de 10%. Ce risque peut être réduit à zéro en utilisant des troupeaux certifiés indemnes comme source d'animaux de remplacement. (COLLINS M.T., 1996)

En l'absence de troupeaux certifiés indemnes, les propriétaires voulant ajouter des animaux à leur troupeau devraient s'efforcer de trouver des marchands réputés comme n'ayant aucun cas clinique de la maladie dans leur troupeau. Le choix du test dépend ensuite du coût et du niveau de risque que l'éleveur peut tolérer. Si le marchand ne veut pas que le test soit une condition de vente, il faut mettre l'animal en quarantaine jusqu'aux résultats des tests.

La sensibilité d'un test de dépistage vis-à-vis de l'infection du troupeau est la probabilité d'obtenir au moins un résultat positif dans un cheptel infecté. (COLLINS M.T., 1996)

Si un seul animal est infecté, la sensibilité de troupeau est la même que la sensibilité individuelle. Si par contre, le troupeau comporte plusieurs animaux infectés, la probabilité de trouver au moins un animal infecté à réponse positive augmente. La sensibilité de troupeau devient supérieure à la sensibilité

individuelle. Des résultats de tests de troupeau, si ces tests sont fiables et réalisés par des laboratoires qualifiés, constituent de meilleures garanties que des résultats de tests individuels sur chaque animal. (COLLINS M.T., 1996)

A défaut de test de troupeau, un test d'achat individuel vis-à-vis de la paratuberculose constitue le minimum de garantie pour prévenir l'introduction de *Mycobacterium paratuberculosis* dans le troupeau. Le coût de ces tests est en effet ridicule comparé au coût requis une fois que l'infection est établie dans le troupeau. Le test d'achat le plus rapide, le moins cher, le plus fiable est l'ELISA. Au minimum l'animal acheté doit être testé. Mais il est préférable que le troupeau entier dont l'animal est originaire soit testé. (COLLINS M.T., 1996)

3.6 - Tests d'exportation :

Les tests doivent être effectués par le receveur. Le test de fixation du complément (CF) est le plus utilisé, mais l'ELISA devient une alternative. Aucun « test de référence » au plan international n'existe. Le tableau II récapitule les caractéristiques des différents tests de diagnostic de la paratuberculose utilisables en France.

Tableau 03 : Diagnostic différentiel des diarrhées chroniques chez les bovins.

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

4-TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE :

4-1 - Traitement :

Des produits pharmaceutiques contre *M.paratuberculosis* ont été testés *in vitro* et *in vivo*. La plupart des antimycobactériens (antimétaboliques et antibiotiques) inhibent *in vitro* la croissance de *M. paratuberculosis*. Les antimétaboliques comprennent les produits antituberculeux tels la cycloserine, l'éthambutol, l'éthionamide et l'isoniaside, l'acide paraaminosalicylique, le thiocarlide et le thiosemicarbazone, phenazines, pyrizinamide, et les produits contre la lèpre tels le dapsonne et autres sulfones. Les antibiotiques actifs cliniquement sont les aminosides. Malgré les résultats prometteurs de tests *in vitro*, la chimiothérapie de la paratuberculose ne fonctionne pas *in vivo*. La discordance entre les résultats *in vitro* et *in vivo* sont dus à l'inaccessibilité de la mycobactérie, qui se multiplie à l'intérieur des phagocytes et des autres cellules de la muqueuse intestinale et des plaques de Peyer. Les antimycobactériens pénètrent dans leur cible intracellulaire avec difficulté.

Il n'existe donc aucun traitement efficace contre la paratuberculose (COLLINS M.T., 1996)

4-2 – Prophylaxie :

4-2.1 - Prophylaxie médicale :

Le premier vaccin contre la paratuberculose a été inventé par Vallée et Rinjard en 1926. Il était composé d'une souche vivante de *M. paratuberculosis* en suspension dans de la paraffine liquide et de l'huile d'olive à laquelle de la poudre de pierre ponce était ajoutée pour son effet irritant et produisant la

formation d'un nodule au niveau du site vaccinal. Les vaccins peuvent être préparés à partir de souches tuées ou bien vivantes atténuées. Un vaccin avec une souche de *M. paratuberculosis* vivante atténuée a été commercialisé (NEOPARASEC®) et utilisé en France mais sa fabrication a été abandonnée en octobre 2001 (COLLINS M.T., 1996)

Le vaccin devait être injecté en sous-cutané pendant le premier mois de vie de l'animal. Cette vaccination n'avait bien sûr aucun intérêt chez l'adulte, moins réceptif à la maladie, mais concernait les jeunes animaux (moins d'un mois si possible). A l'origine, il était prévu d'effectuer un rappel de vaccination, mais ce dernier n'a jamais été pratiqué. Selon une étude, le rappel de vaccination plus d'un an après la primovaccination n'apportait aucune amélioration par rapport à une unique injection au cours du premier mois (COLLINS M.T., 1996)

Un certain nombre de rapports sur l'efficacité de la vaccination a été publié et malgré la différence en terme de type de vaccin utilisé et de condition d'élevage, tous les rapports exposent une réduction du nombre de cas cliniques de paratuberculose. D'après Wentink *et al*, cette baisse est significative, on passe d'une incidence de 7,8 % de cas cliniques avant la vaccination à 1,5% de cas cliniques après vaccination en ayant pris des mesures de prophylaxie sanitaire minimales : séparation des veaux dès la naissance, nettoyage et désinfection du pis avant la prise colostrale. La vaccination permet donc d'obtenir une meilleure résistance des animaux contre l'infection à *M. paratuberculosis* d'un point de vue individuel (WENTINK G.H et al ; 1994)

Malgré un programme de vaccination maintenu sur six ans, le nombre d'excréteurs fécaux ne diminue pas ; la prévalence de la maladie ne cesse d'augmenter. De plus, la vaccination interfère avec les tests ultérieurs visant à vérifier l'absence d'infection, parce qu'elle abaisse probablement le seuil

d'excrétion en dessous du seuil de détection de la coproculture. Elle rend également positifs les résultats sérologiques pendant plusieurs années, jusqu'à 50% des animaux quatre ans après. Un élevage qui vaccine n'a donc plus beaucoup de moyens de mesurer son taux d'infection ; il travaille à l'aveugle en considérant les animaux vaccinés comme non infectés (**VIALARD J.2002**)

Enfin, l'efficacité environnementaux. L'isolement des nouveau-nés aussitôt après la naissance et le du vaccin devrait être évaluée à la lumière des facteurs remplacement du lait maternel par du lait artificiel est probablement plus efficace que la vaccination elle-même. D'après Harris et Barletta, la vaccination des veaux avec un vaccin tué ne prévient pas la transmission de *M.paratuberculosis* ; par conséquent, de bonnes pratiques d'hygiène restent essentielles pour la gestion du troupeau. (**HARRIS N.B., BARLETTA R.G.2001**)

On observe donc une meilleure résistance des animaux contre les infections à *Mycobacterium paratuberculosis* d'un point de vue individuel avec une réduction des niveaux d'excrétion chez chaque animal vacciné, mais au niveau de l'élevage, la vaccination ne réduit pas l'extension de l'infection.

Ces avantages et ces limites amènent à considérer la vaccination comme un outil complémentaire à l'assainissement, d'autant plus utile que l'élevage est lourdement infecté, que les conditions d'hygiène sont mauvaises ou que le contact des jeunes avec les excréments des adultes ne peut être maîtrisé, comme dans des élevages allaitants. Le non recours à la vaccination suite à l'arrêt de la commercialisation du vaccin NEOPARASEC ® a pu apparaître comme un handicap majeur à l'assainissement d'un élevage infecté. Pourtant,

la contamination du jeune peut être maîtrisée efficacement, en élevage laitier notamment, grâce à une bonne gestion de l'hygiène de l'élevage des jeunes animaux. L'abaissement de la pression d'infection par la recherche de

l'excréteur participe à la diminution du risque. L'assainissement sans vaccination nécessite un éleveur motivé et informé et implique un surcoût lié à la recherche des excrétrices. . (HARRIS N.B., BARLETTA R.G.2001)

4-2.2 - Prophylaxie sanitaire :

La prophylaxie sanitaire consiste à prendre différentes mesures destinées à réduire les risques de contamination des jeunes animaux en limitant les contacts entre ces animaux et les déjections où se trouve la mycobactérie. Gay et Sherman GAY J., (SHERMAN D.M.1992) ont proposé les mesures suivantes pour un élevage laitier :

4-2.2.1 - Conduite des veaux à la naissance :

- Supprimer les veaux issus de mères infectées
- Retirer les veaux aux mères dès la naissance
- Désinfecter les trayons des vaches avant le prélèvement de colostrum
- Ne pas utiliser le colostrum issu d'animaux suspects.

4-2.2.2 - Conduite de l'élevage des veaux :

- Séparer les veaux des adultes (alimentation et habitat)
- Séparer les circuits des eaux usées et les aires d'abreuvement afin qu'ils soient distincts pour les veaux comme pour les adultes
- Ne pas épandre les fumures sur les pâtures destinées aux lots de jeunes animaux de moins d'un an
- Pratiquer la marche en avant avec des soins pratiqués aux veaux par la même personne avant les soins aux adultes
- Employer un lactoreplaceur à la place du lait de vache

4-2.2.3 - Conduite des animaux malades :

- Isoler tout animal présentant une diarrhée ou une baisse d'état général dans une aire facile à désinfecter
- Abattre toute la descendance d'une vache déclarée infectée clinique de la paratuberculose
- Nettoyer et désinfecter avec vide sanitaire toute aire contaminée par des cas cliniques

4-2.2.4 - Conduite du troupeau adulte :

- Interdire aux animaux l'accès des mares et des rivières pour l'abreuvement, ainsi que des pâtures trop humides
 - Prévenir la contamination fécale des abreuvoirs et des auges par l'installation de barres. Ne pas placer la nourriture sujette à contamination à même le sol
 - Ne pas utiliser du matériel ayant servi à véhiculer du fumier pour les fourrages
 - Pratiquer régulièrement des tests de dépistage des animaux infectés

En élevage allaitant, ces mesures ne sont pas toutes applicables, les veaux ne pouvant pas être séparés de leur mère dès la naissance. En pratique, deux sous troupeaux sont constitués : un troupeau réunissant les animaux sains, et un autre réunissant les animaux infect

Dans l'ensemble toutes les méthodes de diagnostic de la paratuberculose bovine présentent un même écueil: leur manque de sensibilité vis-à-vis des populations de bovins asymptomatiques infectés. Les tests les plus souvent utilisés à l'heure actuelle sont la coloration de Ziehl-Neelsen et l'ELISA pour les

cas cliniques, et la culture fécale ou l'ELISA pour le dépistage des infectés asymptomatiques. La sensibilité de l'ELISA et de la culture fécale est approximativement de 40 à 50% mais ces deux tests sont inefficaces pour détecter les stades précoces ou chez les jeunes animaux. Leur spécificité de 99 à 100% permet en revanche d'envisager leur utilisation dans des programmes de certification des cheptels. L'élimination des animaux positifs aux tests permet dans ces conditions de réduire rapidement la prévalence de la maladie mais il est impératif d'identifier et de maîtriser les facteurs de risques favorisant la diffusion de l'infection au sein du cheptel.

Il n'existe actuellement aucun traitement connu à cette maladie.

La vaccination permet de réduire le niveau d'excrétion de chaque animal mais ne réduit pas l'extension de la maladie au sein de l'élevage. La seule prophylaxie médicale ne suffit pas, la prophylaxie sanitaire représente l'autre volet essentiel de maîtrise de la maladie.

En France, la production de l'unique vaccin commercialisé a été interrompue.

Lutter contre la paratuberculose consiste donc d'une part, à limiter la dispersion de l'infection grâce à la prophylaxie sanitaire ; et d'autre part à éliminer les animaux infectés grâce à des dépistages précoces, fiables et financièrement supportables.

*La partie
expérimentale*

Matériel et Méthodes

Notre étude a porté sur l'étude microscopique de 50 échantillons de fragment intestinal (iléo-caecale) recueillies entre 15 novembre 2011 et 15 janvier 2012 au niveau de l'abattoir de Tiaret

1-Matériel :

- Lame bistouri
- Appareil d'enrobage de paraffine.
- Microscope optique de type (paralux).
- Bain d'alcool à différentes concentrations.
- Bacs de coloration
- Cassettes
- Lames-portes lames
- Microtome rotatif de type (lei ca-RM2125RP)
- Flacon en verre
- Boites plastiques
- Formol à 10% de concentré
- Eau distillé
- Moules métallique
- Xylène
- Toluène
- Paraffine
- Hémateine-éosine
- Milieu de Montage synthétique EUKIT

2-Méthodes :

2.1-Méthode macroscopique :

Les fragments intestinaux ont été soigneusement examinés juste après l'abattage comme suit :

Un examen visuel et manuel a été effectué pour apprécier la couleur, la consistance, la forme, taille et les plis.

2.2-Méthode microscopique :

Dans le but d'établir un diagnostic microscopique des fragments intestinales (iléo-caecale) prélevés immédiatement après l'abattage des ruminants (ovins et bovin) qui ne présentant aucune lésion macroscopique on fait l'objet d'une étude histologique.

2.2.1- Prélèvement et fixation :

Un fragment iléo-caecal a été prélevé de chaque intestin à l'aide d'une lame bistouri puis fixé dans le formol à 10%. Pour éviter toute altération tissulaire. Quelques prélèvements ont été acheminés ensuite vers le laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem tandis que d'autres ont été envoyés au laboratoire de Batna.

2.2.2- Classification :

Cette technique a été réalisée de façon manuelle au niveau du laboratoire de Mostaganem et par automate au niveau du laboratoire de Batna.

2.2.2.1- technique manuelle :

- Déshydratation :

Chaque échantillon a été placé successivement dans différents bains d'alcool à concentration croissantes :

- Ethanol à 70% pendant 8 heures
 - Ethanol à 96% pendant 8 heures
 - Ethanol à 100% pendant 18 heures
 - Mélange d'éthanol (50%) et chloroforme (50%) pendant 8 heures
 - Chloroforme pur (100%) pendant 4 heures
- Imprégnation (inclusion) :

Les fragments ont été inclus pendant 15 heures dans un bain de paraffine liquide de 57 à 60°C

Le principe de cette étape repose sur le remplacement du chloroforme qui occupe les tissus par une substance solide, cliniquement inactive « paraffine »

2.2.2.2- technique automatique :

Les deux étapes citées ci-dessus ont été réalisées par un automate avec une durée de 2 heures pour chaque passage. Les étapes suivantes ont été réalisées de la même manière l'automate et manuellement.

2.2.3- Confection du bloc :

Les fragments imprégnés de paraffine sont mis dans des moules métalliques contenant la paraffine encore chaude.

En derniers sont recouverts ensuite par des assettes libellées et placés dans un congélateur.

2.2.4- microtomie :

Des coupes histologiques minces (5 micromètre) ont été préparées à partir de paraffine contenant le fragment tissulaire à l'aide d'un microtome. Les rubans de paraffine sont étalés directement sur une lame contenant. Une goutte d'éthanol à 70% puis transférés dans un bain marie (40°C) pour permettre un bon étalement.

2.2.5- coloration :

Le but de la coloration histologique est la différenciation optique qui consiste à faire ressortir des constituants déterminés de la préparation microscopique (**CHEVREAU, BELLOT et CABANIER, 1977**).les différentes étapes de la manipulation sont décrites ci-dessous :

1. Plonger les lames séchées dans le xylène 1, puis dans le xylène 2 pendant une minute pour chaque bain.
2. Plonger ensuite les lames dans l'alcool absolu 1, puis dans l'alcool absolu 2 pendant 2 à 3 minutes.
3. Plonger les lames successivement dans des bains d'alcool à concentration décroissante (95%, 90%, 70%, 60%) pendant 2 minutes, puis rincer les ensuite à l'eau distillée pendant 1 minute.
4. Plonger les lames hydratées dans l'hématoxyline de HARRIS pendant 05 minutes.
5. Laver rapidement à l'eau

6. Laver à l'eau

Colorer pendant 10 minutes à la température de laboratoire dans une solution aqueuse d'éosine.

7. Laver rapidement à l'eau

8. Rincer à l'eau

9. Plonger les lames successivement dans la 2eme série d'alcool concentration croissantes (80%,95%, alcool absolu 1, Pui l'alcool absolu 2) pendant 3minutes pour chaque bain.

10. Mette ces lames dans deux bains de xylène (1 et 2) pendant 1 à 2 minutes pour chacun.

2.2.6- Montage des lames :

Il consiste à étendre sur les coupes une goutte de baume de canada qui est un milieu de montage permanent, permettant l'observation précise des couleurs et des teintes, ainsi que la conservation des préparations.

Après le dernier bain de xylène, mettez une goutte de baume de canada sur une lamelle couvrez l'objet propre pour couvrir la préparation. Afin d'éviter toute formation de bulles d'air, appuyez prudemment à l'aide d'une pince sur la lamelle.

Identifiez les lames (mettez le nom d'organe, le colorant et le fixateur). Faire sécher les préparations dans l'étuve à 37°C pendant une journée ou plus (jusqu'à la solidification du baume de canada) (**GABE, 1968**).

2.2.7 -Observation des prélèvements histologiques :

- On prise des photos à Microscope optique de type (paralux) et à différents grossissement (Quantification des lésions de paratuberculose)

Les critères retenus sont ceux communément admis par les différents auteurs (**GRFFIN, HARTIGAN et NUNN, 1974**), ils concernent :

1 - Aspect de l'épithélium liminal.

La quantification de ce paramètre s'établit de la façon suivante :

- Epithélium absent
- Epithélium liminal d'aspect normal.
- Epithélium liminal présentant une infiltration histiocytaire et poly nucléée sans atteinte structurale
- Epithélium liminal présentant une destruction plus ou moins totale avec généralement la constitution d'une membrane pyogène.

2-infiltration cellulaire inflammatoire du stroma conjonctif :

La composante cellulaire inflammatoire a été caractérisée selon les critères retenus par **STUDER** et **MORO** Les paramètres retenus concernent la présence de nodules lymphocytaires, le dénombrement des cellules mononuclés et comptage des granulocytes neutrophiles.

Résultats et discussion

Résultats et discussion :

L'étude macroscopique des intestins (iléon) et des ganglions lymphatiques mésentériques a permis de constater une hypertrophie des ganglions lymphatiques sans changement visible de l'intestin.

Les résultats de l'étude microscopique des sections d'intestin sont représentés par les figures 06 à 13. Une section d'intestin normal a été photographiée et utilisé comme témoin négatif (figures 04 et 05).

Cinq sections intestinales ont présenté une hypertrophie des plaques de Peyer qui résultent en un épaissement de la muqueuse intestinale avec éloignement des villosités et des cryptes. Ce tissu lymphoïde a fait une progression vers la lumière intestinale dans certains cas (figures 10 et 11).

Les figures 06 et 07 représentent des sections d'intestin grêle présentant des lésions inflammatoires avec une infiltration parfois massive d'une population de cellules mononucléaires (entérite chronique).

Le ganglion lymphatique mésentérique a représenté une infiltration du sinus para cortical par des lymphocytes suite à une hypertrophie des nodules lymphatiques (figures 12 et 13).

Aucune de ces lésions n'est compatible avec la paratuberculose. Certains auteurs ont rapporté la relation entre la progression lymphoïde vers la lumière et la paratuberculose. Cette lésion ne jamais peut à elle seule déterminer une atteinte par la paratuberculose.

D'autres moyens de diagnostic bactériologique et sérologiques sont nécessaires pour la mise en évidence de cette pathologie.

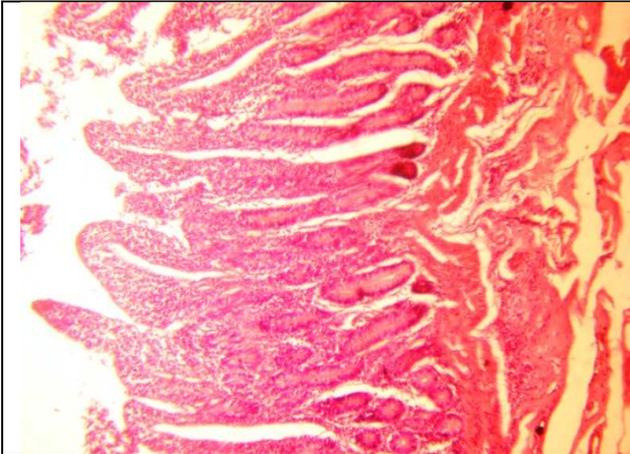


Figure 04 : Intestin, bovin, villosités intestinales normales. H&E, 10x.

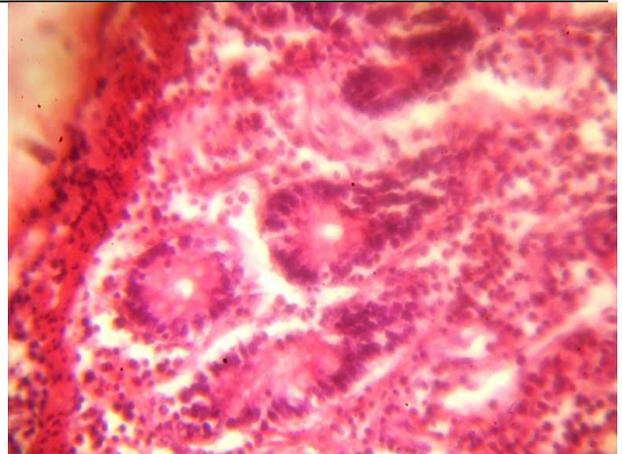


Figure 05 : Intestin, bovin, cryptes de Lieberkühn. H&E, 40x.



Figure 06 : Intestin, bovin, infiltration de la muqueuse intestinale par une population inflammatoire mononucléaire. H&E, 10x.

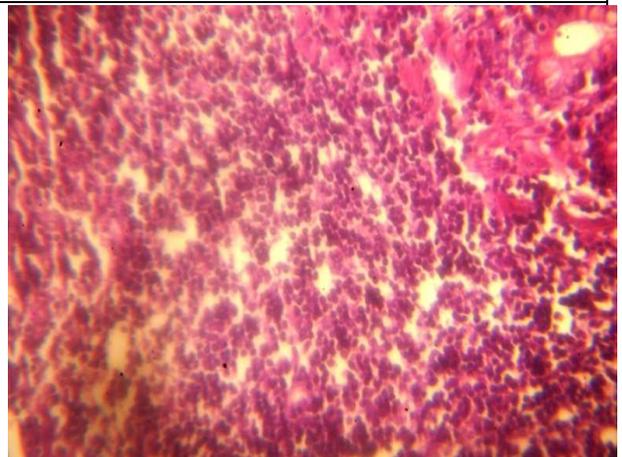


Figure 07 : Intestin, bovin, infiltration de la muqueuse intestinale par une population inflammatoire mononucléaire. H&E, 40x.



Figure 08 : Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde des plaques de Peyer. H&E, 10x.

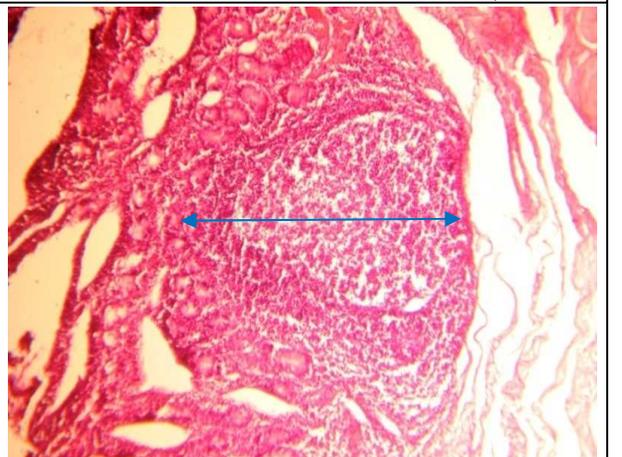


Figure 09 : Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde qui engendre un épaissement de la muqueuse (flèche bleue). H&E, 10x.

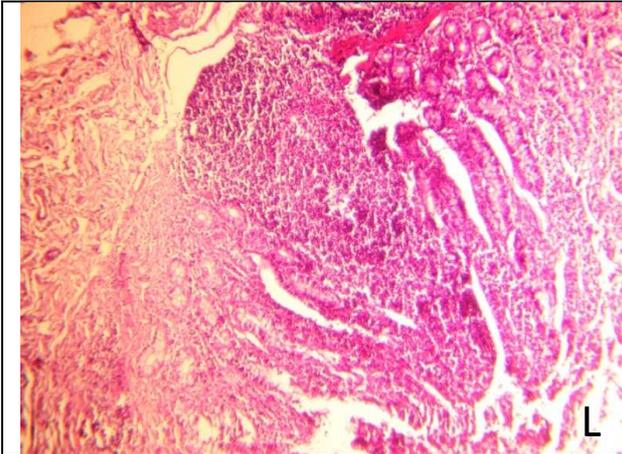


Figure 10 : Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde qui progresse vers la lumière intestinale (L, lumière). H&E, 10x.

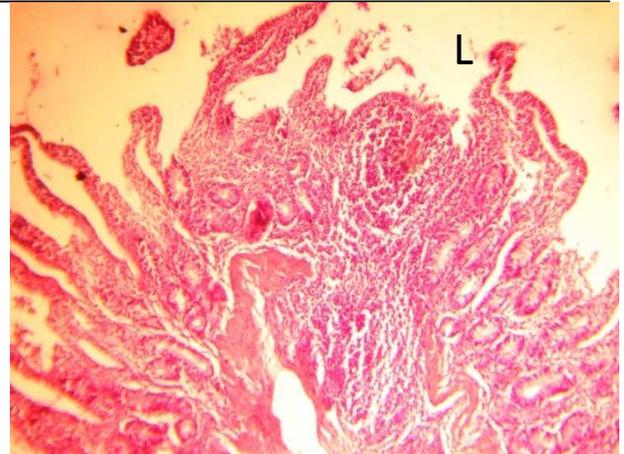


Figure 11 : Intestin, bovin, infiltration de la villosité intestinale par le tissu lymphoïde qui progresse vers la lumière intestinale (L, lumière). H& E, 10x.

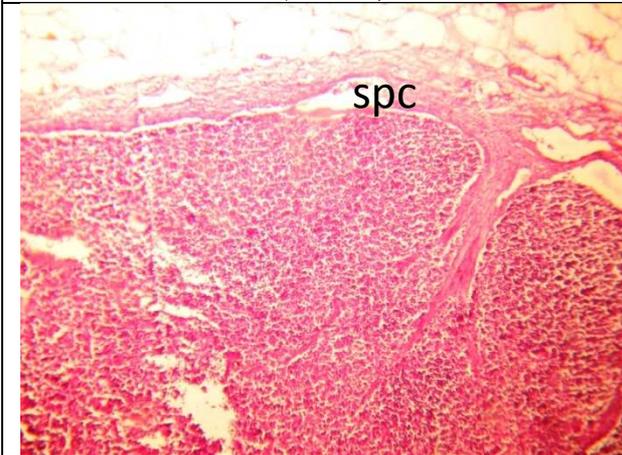


Figure 12 : Ganglion lymphatique mésentérique, bovin, infiltration du sinus para cortical par des lymphocytes (SPC, sinus para-cortical). H& E, 10x.

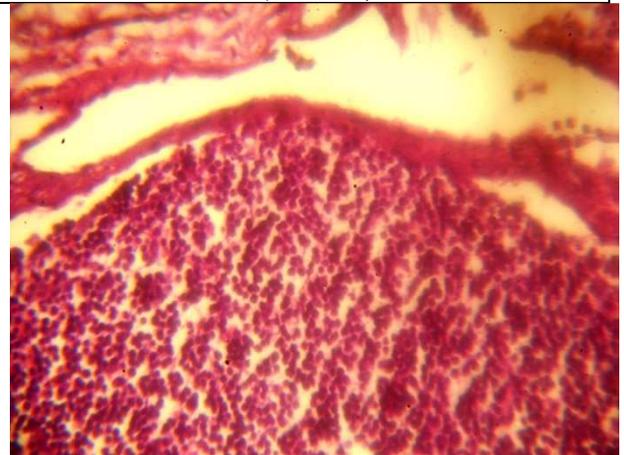


Figure 13: Ganglion lymphatique mésentérique, bovin, infiltration du sinus para cortical par des lymphocytes. H& E, 40x.

Conclusion

Conclusion :

Les résultats de l'étude microscopique des sections d'intestins et de ganglions lymphatiques mésentériques des bovins de différents âges et des deux sexes ont permis de conclure les points suivants :

La moitié des coupes histologiques de l'iléon ont présentées une prolifération du tissu lymphoïde des plaque de Peyer et sa progression vers la lumière intestinale.

D'autres ont présenté des lésions inflammatoires chroniques et non spécifiques. Une hypertrophie des ganglions lymphatiques mésentériques a été aussi observée.

Aucune lésion microscopique compatible avec la paratuberculose n'a été observée.

Les References

1. BEARD P.M., HENDERSON D., DANIELS M.J., PIRIE A., BUXTON D., GREIG A., HUTCHINGS M.R., McKENDRICK I., RHIND S., STEVENSON K., SHARP J.M. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*), Vet. Rec. 1999, **145**, 612-613.
2. BOELAERT F., WALRAVENS K., BIRONT P., VERMEERSCH JP., BERKVEN D., GODFROID J. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in Belgian cattle population, Vet. Microbiol. 2000, **77** (3-4): 269-81.
3. BRUGERE-PICOUX J., DOUART A. Etude clinique de la paratuberculose bovine. In: Actualités en pathologie bovine, Paris: ENVA, 2000, 41-56.
4. BULOIS P., DESREUMAUX P., NEUT C., DARFEUILLE-MICHAUD A., CORTOT A., COLOMBEL JF. Agents infectieux et maladie de Crohn. In: Actualités en pathologie bovine, Paris: ENVA, 2000, 73-77.
5. CHEVREAU, BELLOT ET CABANIRR, 1977
6. CHIODINI R.J. Immunology: resistance to paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1996, **12** (2), 313-339.
7. CHIODINI R.J., VAN KRUININGEN H.J., MERKAL R.S. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects, Cornell Vet, 1984, **74**: 218-262.
8. COCITO C., GILOT P., COENE M., DE KESEL M., POUPART P., VANNUFFEL P. Paratuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. 1994, **7**, 328-45.
9. COLLINS M.T., Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1996, **12** (2), 357-369.
10. DOUART A. Etiologie et épidémiologie de la paratuberculose bovine. In: Actualités en pathologie bovine, Paris: E.N.V.A., 2000, 31-41.
11. GABE 1968
12. GAY J., SHERMAN D.M. Factors in epidemiology and control of ruminants paratuberculosis, Vet. Med. 1992, **87**, 1133-1139.

13. GRANGE J.M. *Mycobacteria* and human disease, Edward Arnold, 2nd ed., London: 1987, 9-61.
14. GRANT I.R., *Mycobacterium paratuberculosis* and Milk, Acta vet. Scand. 2003, **44**, 261- 266.
15. GREIG. A., STEVENSON K., PEREZ V., PIRIE A. A., GRANT J.M., SHARP J.M. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), Vet. Rec. 1997, **140**, 141-143.
16. GRIFFN, HARTIGAN ET NUNN (1974) gross and microscopic lesions in abattoir.
17. HARRIS N.B., BARLETTA R.G. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Veterinary Medicine, Clin. Microbiol. Rev, 2001, **14**(3):489-512.
18. JOHNSON-IFEARULUNDU J., KANEENE J.B. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*, JAVMA, 1997, **110**(12): 1735-1739.
19. KENNEDY D.J., BENEDICTUS G. Prophylaxie de l'infection à *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* chez les animaux de rente, Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 2001, **20** (1), 151-179.
20. LAWRENCE J., HUTCHINSON J. Economic impact of paratuberculosis, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1996, **12**(2) 373-381. 96
21. MANNING E.J.B., COLLINS M.T. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: l'agent pathogène, sa pathogénie et son diagnostic, Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 2001, **20** (1), 133-150.
22. MUSKENS J., BARKEMAA H.W., RUSSCHENA E., VAN MAANENA K., SCHUKKENB Y.H., and BAKKER D. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands, Vet. Microbiol. 2000, **77**(3-4):253-61.
23. PERARD F. Comparaison des différentes méthodes de diagnostic et de dépistage de la paratuberculose bovine. Propositions pour une prophylaxie raisonnée, Thèse Méd Vét, Lyon, 1988, n°85.

36. PETIT H., (Approaches to farm-level control of paratuberculosis in France, Cattle Consultancy days, Danmark, 31 aout 2006), communication personnelle.

24. RADOSTIS O.M., BLOOD D.C., GAY C.C. Veterinary medicine a textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats, and horses, 8th edition, London: Bailiere tundall, 1994, 841-850.

97

25. RADOSTIS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C., HINCHCLIFF K.W. Veterinary medicine, 9ed. Saunders, 2000, 920-934.

40. SANCHEZ J. Méthodes de diagnostic expérimental de la paratuberculose bovine étude bibliographique et réactualisation, Thèse Méd. Vét., Alfort, 1998, n°77.

26. SCHELCHER F., ESPINASSE J., Pathogénie de la paratuberculose bovine. In: actualités 90 en buiatrie. Paris: Buiatrie, 1990, 74-82.

27. SOCKETT D.C., CARR D.J., COLLINS M.T. Evaluation of Conventional and Radiometric Fecal Culture and a commercial DNA Probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* Infections in cattle, Can J. Vet. Res. 1992, **56**, 148-153.

28. STORSET K.A. Immunology of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Infection - Immunodiagnostic Methods, Acta vet. scand. 2003, **44** (3-4), 223-229.

29. SWEENEY R.W. Transmission of paratuberculosis, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1996, **12** (2), 305-311.

30. SWEENEY R.W., WHITLOCK R.H., BUCKLEY C.L., SPENCER P.A. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, J. Vet. Diagn. Invest. 1995, **7**, 488-493.

.

31. VIALARD J. Diagnostic et dépistage de la paratuberculose bovine, Bulletin des GTV.

32. VIALARD J. Epidémiologie de la paratuberculose bovine, Bulletin des GTV Hors-séri

Paratuberculose des Ruminants, 2002, 6-12.

33. WENTINK G.H., BONGERS J.H., ZEEUNWEN A.A.P.A, JAARTSVELD F.H.J.
Incidence of paratuberculosis after vaccination against *Mycobacterium paratuberculosis* in two infected dairy herds. J.Vet. 1994, **B 41**, 517-522.
34. WHITLOCK R.H., BUERGELT C., Preclinical and clinical manifestations of Paratuberculosis (including pathology), Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1996, **12**(2), 345-355.