

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

*L'ETUDE HISTOLOGIQUE DE L'INCIDENCE DE LA
PARATUBERCULOSE CHEZ LES RUMINANT
APPAREMMENT SAINS DANS LA REGION DE TIARET*

PRESENTE PAR:

M^{lle} TAHAR ZERKA
M^{lle} ZERKANE HALIMA

ENCADRE PAR:

D^r HEMIDA H



REMERCIEMENT

Nous dédions ce modeste travail à nos parents qui nous ont soutenues et encouragées.

Nous témoignons notre gratitude à nos professeurs qui nous ont beaucoup aidées pour la réalisation de ce travail.

Nous remercions vivement nos sœurs et nos frères, ainsi que toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien.

Nous tenons à exprimer nos plus sincères sentiments de gratitude aux encadreurs qui n'ont ménagé aucun effort pour nous soutenir.

Nous n'oublions pas bien sûr notre directeur et les différents responsables.

Nous remercions vivement tout le personnel de l'université qui nous a encouragées et aidées.

TABLEAU DE MATIERE

LES ABREVIATIONS
LISTE DU FIGUIRES
LISTE DU TABLEAUX
INTRODUCTION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	01
I-Epidémiologie de la paratuberculose.....	02
I-1-Epidemiologie descriptive.....	03
I-1-1-Espece cible.....	03
I-1-1-1-Ruminant et pseudoRuminant.....	03
I-1-1-2-Existe-t-il un lieu avec la maladie de crohn ?.....	04
I-1-2-Répartition de la paratuberculose.....	08
I-1-2-1-Répartition dans l'espace.....	08
I-1-2-1-1- A l'échelle mondiale.....	08
I-1-2-2-L'évolution dans le temps.....	08
I-1-2-1-1-L'effet de la saison sue la maladie et son expression.....	09
I-2-Epidemiologie descriptive.....	09
I-2-1-Source de contamination et matière virulente.....	09
I-2-2-Facteur de réceptive de la paratuberculosedes ruminant.....	10
I-2-2-1-Implication de système immunitaire domestique.....	10
I-2-2-2-conditions physico-chimiques au sein du type digestif.....	11
I-2-2-3-prédisposition génétique.....	11
I-2-3-Voies de contamination.....	13
I-2-3-1-1-Contamination oro-fecale par le biais de l'environnement de l'eau on des l'aliment.....	14
I-2-3-1-2-Contamination par voie respiratoire.....	14
I-2-3-2-Voie de contamination directe.....	15
I-2-3-2-1-contamination par voie sexuelle.....	15
I-2-3-2-2-Contamination verticale (in utero).....	15
I-2-3-2-2-1Dans l'espèce bovin.....	15
I-2-3-2-2-2-Chez les petits ruminants.....	15
I-2-3-2-2-3-Risque inhérent a la transformation embryonnaire.....	16
I-2-3-2-3-Contamination par le colostrum on le lait (contamination pseudo-verticale).....	17
I-2-3-3-Principe facteurs de risque de la paratuberculose en élevage.....	18
I-2-3-4-Modèle infectieux expérimentale.....	19
I-2-3-4-1-Difficultés rencontrées a l'établissement du modèle infectieux.....	19
I-2-3-4-2-Mecanique généraux.....	20
I-2-3-4-Etude du modèle infectieux expérimentale chez les petits ruminants domestiques.....	21
I-2-3-4-3-1-Les ton sillés pharyngique comme porte d'entrée ?.....	22
I-2-3-4-4-Etude du modèle infectieux expérimentale chez les grands ruminants domestiques.....	22
I-2-3-4-5- La grande mammaire recevoir et voie de contamination potentielles.....	23
I-2-4-Perssistance.....	24
I-2-4-1-Perssistance dans le sol.....	24
I-2-4-1-1-Facteurs influençant la persistance de nap dans le sol.....	26

I-2-4-1-2-Phénomène de dormance.....	27
I-2-4-2-Persistance dans les liquides et les sédiments.....	28
I-2-4-3-Persistance dans la matière organique.....	29
I-2-4-4-Persistance dans les invertébrés et protozoaires.....	31
I-2-5-Résistance du bacille.....	34
I-2-5-1-Résistance aux agents chimiques.....	34
I-2-5-2-Résistance de map dans les liquides.....	34
I-2-5-2-1-Resistance de map a la stérilisation dans le lait.....	34
I-2-5-2-1-1-Decontamination par application d'une forte pression hydrostatique a températ ambiante.....	35
I-2-5-2-1-2-Décontamination par pasteurisation.....	35
I-2-5-2-1-2-1-Efficacite et source déviations de la pasteurisation (HTST/UHF 72° pd seconds).....	36
I-2-5-2-1-2-2-Efficacite et source déviations de la pasteurisation a basse température.....	37
I-2-5-2-1-2-3-Application particulier au colostrum.....	38
I-2-5-2-2-Résistance à la décontamination de l'eau.....	38
II-Méthodes de diagnostic et de Dépistage de la paratuberculose.....	39
II-1-Diagnostic epidemio-clinique.....	40
II-1-1-Diagnostic différentiel (cas particulier des bovins).....	40
II-2-Diagnostic necropsique.....	42
II-3-Examen de laboratoire.....	42
II-3-1-Techniques directes.....	43
II-3-1-1 bactérioscopie.....	43
II-3-1-1-1-Description et mise en ouvre.....	43
II-3-1-1-2-Caractéristiques	43
II-3-1-2-Histopathologie	44
II-3-1-2-1-Description et mise en ouvre.....	44
II-3-1-2-2-Caractéristiques.....	44
II-3-1-3 Culture.....	45
II-3-1-3-1-Coproculture.....	45
II-3-1-3-1-1-Description et mise en ouvre.....	45
II-3-1-3-1-2-Caractéristique.....	47
II-3-1-3-1-3-Coproculture de mélange.....	48
II-3-1-3-1-4-Méthode radiométriques.....	49
II-3-1-3-2-culture a partir d'échantillons tissulaires.....	50
II-3-1-4-Détection par PCR.....	50
II-3-1-4-1-intérêt du séquençage génomique de Map dans la méthode PCR.....	50
II-3-1-4-2-PCR complée a un migration sur gel d'agarose.....	51
II-3-1-4-2-1-Descriptions et mise en ouvre.....	51
II-3-1-4-2-2-Caractéristiques.....	51
II-3-1-4-3 PCR en temps réel (systèmeTapMan).....	52
II-3-1-4-3-1-Descriptions et mise en ouvre.....	53
II-3-1-4-3-2-Caractéristiques.....	53
II-3-1-4-4- PCR multiplexe.....	53

II-3-2-Technique indirectes.....	53
II-3-2-1-Evolution de la réponse immunitaire chez un animal infecte.....	54
II-3-2-2-Influence de la période peripartum sur les tests immunologique.....	54
II-3-2-3-Messure de la réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	55
II-3-2-3-1-teste cutané intradermique et teste à l'interféron gamma	56
I-3-2-3-1-1-Description et mise en oeuvre.....	57
II-3-2-3-1-2-caractéristiques.....	57
II-3-2-3-1-2-1-IDTc.....	57
II-3-2-3-1-2-2-TCI et teste IFN.....	58
II-3-2-3-2-Autres tests représentatifs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	58
II-3-2-4-Mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale	58
II-3-2-4-1-Serologie, Méthode Elisa indirect.....	60
II-3-2-4-1-1-Description et mise en oeuvre.....	60
II-3-2-4-1-2-Comparaison des différents tests ELISA, caractéristiques analytiques.....	60
II-3-2-4-1-3-Serologie sur lait (individuel ou mélange).....	60
II-3-2-4-1-3-1-individuel.....	62
II-3-2-4-1-3-2-mélange.....	66
II-3-2-4-2-Serologie : immunodiffusion en gélose.....	66
II-3-2-4-3-Serologie teste de fixation de complément.....	67
II-3-2-4-4-Tests sérologiques quelles combinaisons possibles.....	67
II-4-Bilan.....	68
II-4-1-Données pour les bovins.....	68
II-4-2-Evaluation de ces données pour les ovins et caprins.....	69
III-Conduites à tenir.....	69
III-1-Traitement et prophylaxie.....	72
III--1-2-Prophylaxie.....	74
III--1-2-1-Prophylaxie médicale.....	75
III--1-2-2-Prophylaxie sanitaire.....	75
III--1-2-2-1-Conduite des veaux à la naissance.....	75
III--1-2-2-2-Conduite de l'élevage des veaux.....	77
III--1-2-2-3-Conduite des animaux malades.....	77
III--1-2-2-4-Conduite des troupeaux adultes.....	77
PARIE EXPERIMENTALE.....	77
IV : Matériel et Méthode.....	77
IV .1 Matériel	79
I V .2-Méthodes.....	80
I V.2.1-Examen macroscopique.....	80
I V.2.2-Examen microscopique.....	81
I V.2.2.1- Prélèvement et fixation.....	81
I V.2.2.2- Clarification.....	81
I V.2.2.3- Confection du bloc	81
I V.2.2.4- Microtomie.....	81
I V.2.2.5- Coloration	81

I V.2.2.6- Montage des lames	82
I V.2.2.7 -Observation des coupes histologiques	82
I V.3- Coloration de Ziehl Neelson	82
I V.3.1-Préparation des solutions de coloration.....	83
I V 3.2- TECHNIQUE.....	83
I V 3.2 .1 : Temps de coloration.....	83
I V 3.2 .2 : Temps de décoloration	84
I V 3.2. 3 : Temps de contre coloration.....	84
I V : Résultats et discussion.....	84
I V.1: Résultat	85
I V .2: Discussion.....	86
	86
	88

LES ABREVIATIONS

AC : Anticorps

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BVD : Diarrhée Virale Bovine

CFU : Colony Formant Unit (unité anglo-saxonne)

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

GMQ : Gain Moyen Quotidien

HEY : Herrold's egg yolk = milieu de Herrold

IBR : Rhinotrachéite Infectieuse Bovine

IDTc : intradermotuberculation comparative

IFN: interféron

Johnin-PPD : Johnin-Purified Protein Derivative

LB : Lymphocyte B

LD : Limite de détection

LT: Lymphocyte T

Map: Mycobacterium avium spp. paratuberculosis

MC : Maladie de Crohn

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

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHA : phytohémagglutinine

PPD : Dérivé Protéique Podifié

RFLP : Restriction-Fragment Length Polymorphism

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

TCI : test cutané intradermique

Test IDT : Test d'intradermoruberculation

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

LISTE DU FIGURES

- Figure01 agrandissement au microscope électronique montrant un blastocyste bovin avec des germes de *Map* (flèche) adhérant à la zone pellucide (ZP) (page : 17)
- Figure02 présences de granulome dans la muqueuse et sous muqueuse intestinales (page : 21)
- Figure03 diarrhée chez un bovin (page : 21)
- Figure04 aspect mat d'une matière (page : 21)
- Figure05 séquence Dps-like chez *M. smegmatis* et son homologue chez *Map*. (page : 27)
- Figure06 séquence RelA chez *Mycobacterium tuberculosis* et RelA-like chez *Map*. (page : 28)
- Figure07 Représentation circulaire de la souche K-10 de *Map* (page : 51)
- Figure08 représentation des amorces de Millar et Vary sur l'extrémité 5' d'IS900. (page : 52)
- Figure09 résultat de PCR multiplexe après migration par électrophorèse (page : 54)
- Figure10 évolution des deux composantes de la réponse immunitaire et de l'excrétion. (page : 56)
- Figure11 résultats positifs obtenus avec les diverses méthodes diagnostiques chez les caprins (Goat 1 à15) (Munjal, S.K. *et al.* 2007) (page : 73)
- Figure12 Aspect normal de l'intestin grêle (iléon) Bovin H&E. 10X (page : 87)
- Figure13 Hyperplasie lymphocytaires (nodules lymphocytaires) avec épaissement de la paroi intestinale. H&E. 10X (page : 87)
- Figure14 Hyperplasie lymphocytaires (nodules lymphocytaires) avec épaissement de la paroi intestinale. H&E. 10X. (page : 87)
- Figure15 Projection du nodule lymphocytaire vers la lumière intestinale. H&E. 4 X. (page : 87)
- Figure16 Projection du nodule lymphocytaire vers la lumière intestinale. H&E. 10 X. (page : 87)
- Figure17 Granulome inflammatoire prédominé par des cellules épithélioïdes. H&E. 40 X. (page : 87)

LISTE DU TABLEAUX

<u>Tableau 01</u>	Analyse des facteurs de risque pour les sujets atteints de MC, en comparaison aux sujets sains (Bernstein, C.N. <i>et al.</i> 2007). (page : 07)
<u>Tableau 02</u>	Principaux facteurs de risque (majeurs et mineurs) de la paratuberculose en élevage (page : 19)
<u>Tableau 03</u>	diagnostic différentiel des diarrhées chroniques chez les bovins. (page : 41)
<u>Tableau 04</u>	caractéristiques et qualités des principaux tests ELISA disponibles (page : 62)
<u>Tableau 05</u>	spécificité des 5 tests ELISA comparés. (page : 63)
<u>Tableau 06</u>	sensibilité des 5 tests ELISA comparés pour leur capacité à détecter les animaux excréteurs (test de référence : coproculture (page : 64)
<u>Tableau07</u>	Sensibilité du kit ELISA Pourquier pour une utilisation sur lait de mélange (page : 67)
<u>Tableau 08</u>	caractéristiques et qualités des principaux tests utilisés dans le cadre du diagnostic de la paratuberculose (page : 70)
<u>Tableau 09</u>	Incidence de la paratuberculose chez les ruminants (page : 86)

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis, en 1990.

Depuis 2001, la paratuberculose est considérée par l' Office International des Epizooties comme une maladie d'importance globale majeure ; elle est classée dans la liste B des maladies transmissibles (et donc considérée comme une maladie transmissible ayant une importance socio-économique et/ou de santé publique pour les animaux de compagnies et de production) ; cette maladie est décrite sur tous les continents, où elle affecte communément les ruminants domestiques, mais également de nombreuses espèces sauvages.

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

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

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

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

*EPIDEMIOLOGIE DE LA
PARATUBERCULOSE:*

I.EPIDEMIOLOGIE DE LA PARATUBERCULOSE:

I.1. Epidémiologie descriptive:

I.1.1. Espèces cibles:

I.1.1.1. Animales:

I.1.1.1.1. Ruminants et pseudo-ruminants:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Au Royaume-Uni, la prévalence de la maladie était de 13 cas sur 100 000 personnes en 2001, avec 3000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Elle affecte typiquement les personnes âgées de 16 à 25 ans, bien qu'elle puisse se déclarer dans l'enfance ou plus tard à l'âge adulte.

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

La protéine *NOD2* est un récepteur responsable de la reconnaissance des peptidoglycanes bactériens, et donc notamment des mycobactéries ; ainsi, une activité altérée de ce récepteur (notamment suite à une mutation génétique du gène *NOD2*) engendre une détérioration de la réponse immunitaire contre les mycobactéries, et facilite leur incorporation intracellulaire.

La sensibilité aux infections bactériennes intestinales, notamment intracellulaires, est alors augmentée. La proportion de cas attribuée à une mutation de ce gène, est comprise entre 15 et 25%, ce qui suggère l'existence d'autres facteurs causals importants (Newman, B. *et al.* 2003).

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

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

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

- *DLG5* (Stoll, M. *et al.* 2004)
- *ABCBI*, aussi connu comme *MDR1* (Brant, S.R *et al.* 2003)
- *CARD 4*, aussi connu comme *NOD1* (Mc Govern, D.P. *et al.* 2005)
- *TNFSF15* (Yamazaki, K. *et al.* 2005)
- ***IL23R* (Duerr, R.H. *et al.* 2006)**
- *PHOX2B*, *NCF4* et *FAM92B* (Rioux, J.D. *et al.* 2007)
- ***ATG16L1*** (Hampe, J. *et al.* 2007 ; Rioux, J.D. *et al.* 2007) ; situé sur le chromosome 2, il code pour une protéine exprimée dans les cellules épithéliales intestinales. Il appartient à une

famille de gènes impliquée dans l'autophagie, en régulant la dégradation protéique dans les lysosomes, la présentation antigénique, l'organisation des messages entre cellules et autres étapes essentielles à l'initiation et à la régulation de la réponse inflammatoire.

- **IRGM** (gène permettant d'induire l'autophagie, et notamment le contrôle de *Mycobacterium tuberculosis* au sein des macrophages humains), situé sur le chromosome 5, *NKX2-3* et *PTPN2* (Parkes, M. *et al.* 2007)

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

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

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

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

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

Chez des patients atteints de la maladie de Crohn, l'ADN de *Map* a été détecté dans plus de 90% des cas par PCR, dans 70% des cas par hybridation in-situ (Sechi, L.A. *et al.* 2001) et l'ARN de *Map* a été mis en évidence par RT-PCR dans 100% des cas d'une autre étude (Mishina, D. *et al.* 1996).

Map a été isolé à partir de lait humain (Naser, S.A. *et al.* 2000), de fèces, de tissu intestinal et de sang périphérique chez des patients atteints de maladie de Crohn.

Les tests sérologiques spécifiques de *Map* (méthode ELISA) sont plus souvent positifs, de manière significative, chez les patients atteints de la maladie de Crohn que chez les individus contrôle (Collins, M.T. *et al.* 2000b). Mais cela n'a été démontré que par une seule étude.

De plus, une antibiothérapie ciblant les bacilles de *Map* (association de rifabutine, clarithromycine et clofazimine pendant une durée de 17 à 54 mois) chez des patients atteints de

la maladie de Crohn a permis une diminution des signes cliniques associés à la maladie chez de nombreux patients, voire la rémission de celle-ci (sans toutefois empêcher les rechutes).

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

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

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

37 % des patients atteints de MD ont une ou plusieurs mutations sur le gène *NOD2* (contre 14 % parmi le groupe contrôle, $P < 0,001$) ; les hétérozygotes pour la(les) mutation(s) ont un risque trois fois plus élevé de déclarer une MC, les homozygotes (double-mutant) pour ces mutations ont un risque 30 fois plus élevé.

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

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

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

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

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

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

Tableau 1 : Analyse des facteurs de risque pour les	Odd-	P	Intervalle de confiance à
Porteur de mutation NOD-2 (oui vs. non)	3,52	<0,001	2,19 – 5,66
Sérologie Map (séropositif vs. séronégatif)	1,08	0,74	0,69 – 1,66
Fumeur (déjà vs. jamais)	1,99	0,001	1,30 – 3,02
Historique familial de maladie inflammatoire intestinale	2,27	0,01	1,20 – 4,28

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

Des bacilles de *Map* viables peuvent être excrétés dans le lait, alors que l'efficacité de la pasteurisation en routine est mise en doute (cet aspect sera abordé ultérieurement) ; de plus, de nombreux fromages sont fabriqués à partir de lait, de brebis ou de vache, non pasteurisé

La présence de *Map* a été détectée dans l'eau potable de plusieurs réseaux d'adduction municipaux (Mishina, D. *et al.* 1996) ; il est résistant aux traitements chlorés usuels.

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

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

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

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

I.1.2. Répartition de la paratuberculose:

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

I.1.2.1. Répartition dans l'espace:

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

I.1.2.1.1. A l'échelle mondiale

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

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

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

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

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

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

I.1.2.2. Evolution dans le temps:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I.2. Epidémiologie analytique :

I.2.1. Sources de contamination et matières virulentes :

I.2.1.1. Sources de contamination

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

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

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

Comme nous l'avons mentionné auparavant, il existe une certaine spécificité d'espèce pour les souches de *Map*, en particulier pour les souches ovines. Cependant, les

contaminations entre espèces ont été décrites à plusieurs reprises, et reproduites expérimentalement entre ruminants domestiques, que ce soit au pré ou à l'étable. Cette transmission ne s'accompagne pas forcément de manifestations cliniques mais peut jouer un rôle non négligeable sur le plan épidémiologique.

I.2.1.2. Matières virulentes:

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

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

Différentes études ont mis en évidence (cf. infra) l'existence d'une excrétion du bacille paratuberculeux dans le sperme, même en l'absence d'excrétion fécale. Cependant la dose infectieuse est probablement insuffisante pour infecter la femelle saillie ou inséminée par voie génitale.

Le transfert embryonnaire a également été évoqué parmi les facteurs de risque de transmission de la paratuberculose

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

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

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

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

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

I.2.2.1. Implication du système immunitaire:

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

- l'immaturation du système immunitaire, ayant pour conséquence des capacités de défense inférieures à celles de l'adulte

- le nombre de plaques de Peyer plus élevé qu'à l'âge adulte
- de plus, la présence d'anticorps maternels (principalement dans le colostrum, mais aussi le lait) pourrait favoriser la capture des mycobactéries par les cellules M des plaques de Peyer dans l'intestin. Nous verrons ultérieurement que le passage de *Map* dans le lait ou colostrum tend de plus à augmenter l'infectiosité du bacille.

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

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

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

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

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

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

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

I.2.2.3. Prédisposition génétique:

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

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

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

Ce phénomène, si il se confirmait, serait d'autant plus important à exploiter dans le cadre de la

paratuberculose, que la maladie est incurable, et qu'il n'existe aucun vaccin complètement efficace à ce jour

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I.2.3. Voies de contamination:

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

La transmission directe de la mère au jeune (considérée comme pseudo-verticale) est

documentée à la fois via le colostrum et le lait, le colostrum semblant plus fréquemment et plus fortement contaminé que le lait.

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

I.2.3.1. Voies de contamination indirecte:

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

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

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

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

I.2.3.1.2. Contamination par les voies respiratoires:

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

En effet, à cause de la forte teneur lipidique (60%) de la membrane cellulaire constituée d'une double couche, *Map* possède des propriétés hydrophobes ; de ce fait, les bacilles se trouveraient concentrés au sein des bulles d'air présentes dans les colonnes d'eau, mais également au sein des aérosols qui se forment à l'interface air/eau.

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

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

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

I.2.3.2. Voies de contamination directe:

I.2.3.2.1. Contamination par voie sexuelle:

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

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

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

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

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

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

I.2.3.2.2.1. Dans l'espèce bovine:

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

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

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

I.2.3.2.2.2. Chez les petits ruminants:

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

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

La descendance d'une seule brebis, parmi les 54 qui étaient au stade sub-clinique, était affectée

(1,8%), alors qu'elle ne l'était pas pour les 47 non-infectées.

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

I.2.3.2.2.3. Risque inhérent à la transplantation embryonnaire:

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

Plusieurs études ont analysé ce risque.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

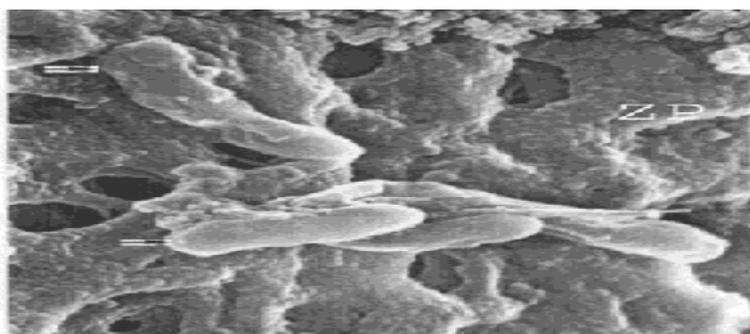


Figure1 : Agrandissement au microscope électronique montrant un blastocyste bovin avec des germes de *Map* (flèche) adhérant à la zone pellucide (ZP)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RISQUES MAJEURS	
Parturition et période néonatale	Période d'élevage des veaux
<ul style="list-style-type: none"> ● Absence de nurserie ● Litière accumulée, nettoyage et désinfection peu fréquents ● Absence de séparation pour le vêlage des vaches atteintes ● Proximité d'animaux cliniquement atteints ou suspects ● Absence de séparation des nouveau-nés de la mère ● Elevage de type allaitant ● Consommation du colostrum de la mère éventuellement infectée 	<ul style="list-style-type: none"> ● Veaux alimentés avec du colostrum potentiellement contaminé ● Veaux alimentés avec du lait potentiellement contaminé ● Veaux vivants dans les mêmes locaux que les mères ● Alimentation du veau pouvant être contaminés par des fèces
RISQUES MINEURS	
Du sevrage à l'âge adulte	A l'âge adulte
<ul style="list-style-type: none"> ● Contact avec des vaches adultes ou avec du fumier ● Contamination possible de l'alimentation ● Contamination possible de l'abreuvement ● Pâturage commun avec des adultes ● Contamination des prés par le fumier 	<ul style="list-style-type: none"> ● Mélange avec des bovins d'origine non contrôlée ● Fréquence élevée des introductions depuis des cheptels non contrôlés (achat)

I.2.3.4. Modèle infectieux expérimental:

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

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

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

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

L'utilisation des ruminants est donc limitée, et de nombreux autres modèles animaux ont été

utilisés, incluant le poulet, le cochon d'Inde, le hamster, la souris ou bien encore le lapin...qui n'expriment pas aussi pleinement l'infection.

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

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

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

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

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

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

Les différents modèles infectieux bovin, ovin et caprin, ou chez des ruminants sauvages utilisés dans la littérature, et analysés dans l'étude citée ci-dessus

I.2.3.4.2. Mécanismes généraux:

D'après le schéma général qui est aujourd'hui admis par l'immense majorité des équipes du domaine, les bacilles, lors de la contamination qui est la plus fréquente, pénètrent dans la muqueuse intestinale en regard des formations lymphoïdes associées à l'intestin (principalement les plaques de Peyer de l'iléon), sont phagocytés par les macrophages résidents et s'y multiplient.

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

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

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

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

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

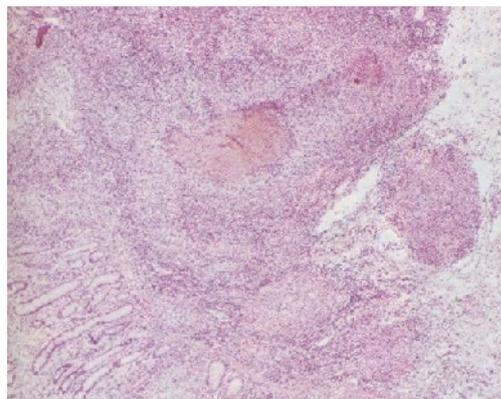
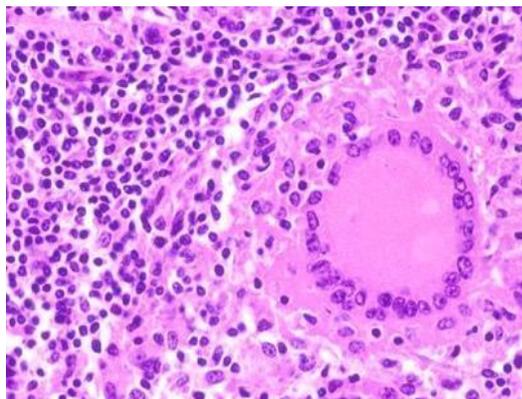


Figure2 :Présences de granulome dans la muqueuse et sous muqueuse intestinales

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



Figure6 :Diarrhée chez un bovin

Figure7 : Aspect mat d'un matière fécale

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

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

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

Le modèle infectieux a été étudié chez les petits ruminants domestiques à l'aide d'une souche

ovine de *Map* (Begg, D.J. *et al.* 2005b), l'inoculation consistant en l'administration par voie orale de 4 doses de 1×10^9 UFC de *Map* réparties sur une période de deux semaines.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

domestiques:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L'incubation de *Map* dans des conditions de basse pression en oxygène ou dans des milieux hyperosmolaires augmente sa capacité à pénétrer dans les cellules épithéliales de l'intestin

(Bermudez, L.E. *et al.* 1997), notamment par la présence de la protéine de 35 kDa précédemment citée.

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

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

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

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

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

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

I.2.4. Persistance:

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

I.2.4.1. Persistance dans le sol:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Il sera ainsi important de mesurer les niveaux de baisse, car cela permettrait l'extrapolation à

des situations où les niveaux de contamination initiaux seraient différents. Les échelles de décontamination estimées fluctuent entre 2,2 et 0,4 log par mois ; les niveaux de décontamination étant plus importants dans les zones exposées aux UV par rapport aux zones ombragées.

I.2.4.1.1. Facteurs influençant la persistance de *Map* dans le sol:

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

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

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

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

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

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

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


```

N.ptb 1 VAEENGAQAALGAPAEFPE...NFVETPEEPTSEKTSSEFARKAVKGLA 48
N.tb 1 VAEEDQITVQAVAPPTREARALEPALETPESEPVETLAKTSESRSEGVKQELA 50
N.ptb 49 SEHTACREFTINFWLEPIVWSEKTYPKANUQLCRAPFEVADQPHASQIEM 58
N.tb 51 SEHTACREFTINFWLEPIVWSESVPEADQSLCRAPFEVADQIAGLQEO 100
N.ptb 59 GGDVYITHDLAVATILABELGMDTTLVAALLHDTVEDCYTFLAGLESEFC 148
N.tb 101 GGDVYITHDLAVANILABELGMDTTLVAALLHDTVEDCYTFLALTSSEFC 150
N.ptb 149 SEVGHVLDGVTKLDRVVLGSAASGRTIKMIDPMARDPRVVIKVAIDRLH 198
N.tb 151 SEVGHVLDGVTKLDRVVLGSAASGRTIKMIDPMARDPRVVIKVAIDRLH 200
N.ptb 159 NHRITMRFLEPKQARKARETLEVTAPLAHLRQASVNGELEDLAFPLILRF 248
N.tb 201 NHRITMRFLEPKQARKARETLEVTAPLAHLRQASVNGELEDLAFPLILRF 250
N.ptb 249 KEDDEIVELVAGRAPQDITFLAVRADKINTLNASKIKACVDDQIPQIYWD 298
N.tb 251 KESSEIVELVAGRAPQDITFLAVRADKINTLNASKIKACVDDQIPQIYWD 300
N.ptb 259 EYQKNIWNGEDDDTHLWAVEFLCDEERDCTAAWGVVHSLAQEMKGRFK 348
N.tb 301 EYQKNIWNGEDDDTHLWAVEFLCDEERDCTAAWGVVHSLAQEMKGRFK 350
N.ptb 349 DTYIAQERYVYVYGLHFTVVGPEKLELWQIRTRDMRTAENGLIAJNRYK 398
N.tb 351 DTYIAQERYVYVYGLHFTVVGPEKLELWQIRTRDMRTAENGLIAJNRYK 400
N.ptb 359 SARNGVGLRHHAAREEDMAMRQILLWQREADPGEFLSELRVYDLAVC 448
N.tb 401 SARNGVGLRHHAAREEDMAMRQILLWQREADPGEFLSELRVYDLAVC 450
N.ptb 449 KTFVPTPKGAVTTPPTSTPTDFAVAVHTRVQHECTGARVNDQVVALERK 498
N.tb 451 KTFVPTPKGAVTTPPTSTPTDFAVAVHTRVQHECTGARVNDQVVALERK 500
N.ptb 459 LENGEVVEVFTSKANVGRSRUWQPVVSEKAKIKQNFARQKRRKALK 548
N.tb 501 LENGEVVEVFTSKANVGRSRUWQPVVSEKAKIKQNFARQKRRKALK 550
N.ptb 549 AGKDKAREVWRQDLPQRLVNAEESAVARELHYADASALYTAQDGHV 598
N.tb 551 TQKDKARVWRQDLPQRLVNAEESAVARELHYADASALYTAQDGHV 600
N.ptb 559 GASHVORILLABELGGIDOTEDLAEKSTFTNLSEFQSDVGVVFGAP 648
N.tb 601 GASHVORILLABELGGIDQABELAEKSTFTNLSEFQSDVGVVFGAP 650
N.ptb 659 GVLTSLAKCCFVGGDQIMGVTRGGQSVNKRIDCINRASLQQQSEKIE 698
N.tb 651 GVLTSLAKCCFVGGDQIMGVTRGGQSVNKRIDCINRASLQQQSEKIE 700
N.ptb 699 VHWAPSPSEVFLVAIQVERLDRHLLSDVTRVLDKKNVLSASVPTSD 748
N.tb 701 VHWAPSPSEVFLVAIQVEALDEHLLSDVTRALADKKNVLSASVPTSD 750
N.ptb 749 RYVIGRPTFENGDFKILGHLIAVVRVSGVYDVTYVTA 789
N.tb 751 RYVIGRPTFENGDFKILGHLIAVVRVSGVYDVTYVTA 790

```

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

I.2.4.2. Persistance dans les liquides et les sédiments:

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

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

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

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

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

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

De plus, la survie de *Map* apparaît plus longue, de 12 à 36 semaines, dans les sédiments que dans la colonne d'eau (au cours de cette même expérience, la survie dans les sols

ou dans des matières fécales, dans les mêmes conditions d'obscurité, ne fut que de 12 semaines) (Whittington, R.J. *et al.* 2005).

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

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

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

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

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

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

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

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

- restreindre l'accès aux cours d'eau si l'endroit est/a été fréquenté par des troupeaux infectés dans les 12 derniers mois.
- la mise en suspension des sédiments peut entraîner un plus fort niveau de contamination de la colonne d'eau (puisque *Map* semble survivre plus longtemps dans les sédiments). Pour cette raison, il est préférable d'abreuver les animaux à partir de l'eau collectée dans des citernes et dans des abreuvoirs, plutôt que de laisser les animaux consommer des eaux troubles ou de les laisser entrer dans l'eau pour s'abreuver et donc mettre en suspension les sédiments.

I.2.4.3. Persistance dans les matières organiques:

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

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

stocké dans une fosse.

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

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

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

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

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

Les matières fécales étudiées furent inoculées par *Map* de façon à atteindre une concentration de 10⁶ UFC/g

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

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

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

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

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

lisier.

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

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

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

I.2.4.4. Persistance chez les invertébrés et protozoaires:

I.2.4.4.1. Invertébrés:

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

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

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

Dans la question de la possible intervention des nématodes dans l'épidémiologie de la paratuberculose, il peut être intéressant de noter que les conditions environnementales favorables aux larves de nématodes de troisième âge sont également favorables à la survie de *Map* (c'est-à-dire une protection contre les radiations solaires et la chaleur, la présence d'humidité).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I.2.4.4.2. Protozoaires:

Les protozoaires sont reconnus comme les hôtes d'un certain nombre de bactéries pathogènes ; ils permettent une forte réplication des bactéries au sein des vacuoles, une persistance sous forme de kystes, et demeurent ainsi protégés de certains désinfectants chimiques tels que le chlore.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

la clarithromycine.

I.2.5. Résistance du bacille:

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

I.2.5.1. Résistance aux agents chimiques:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Concernant le niveau de contamination initial, la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que

la contamination d'un lait de tank peut au maximum atteindre 4 à 5 log UFC/ml. Cette teneur est principalement due à une contamination fécale, et à une moindre mesure aux bactéries excrétées par la mamelle (rappelons que des échantillons de lait obtenus de manière stérile chez neuf vaches en phase sub-clinique de paratuberculose ont montrés une concentration en *Map* variant de 2 à 8 UFC/ml (soit de 0,3 à 0,9 log UFC/ml) (Sweeney, R.W. *et al.* 1992).

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

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

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

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

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

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

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

I.2.5.2.1.2. Décontamination par pasteurisation.

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

- A 55°C, l'inactivation thermique observée est minimum tant sur les germes isolés que sur les germes en agrégats.

- A 60°C, D est de 8,6 à 11 min pour les germes en agrégats ; de 8,2 à 14,1min pour les germes isolés.

Une deuxième étude obtint les résultats suivants ;

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

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

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

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

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

Les résultats obtenus par les différents auteurs sur ce procédé divergent quant à son efficacité. Ces divergences peuvent en partie être expliquées par différents points : choix du matériel de pasteurisation, méthodes de détection et milieux de culture utilisés, séparation ou non des amas, contaminations initiales enregistrées, variations de la sensibilité thermique des différentes souches de *Map* utilisées, conditions d'utilisation de souches fraîchement isolées ou adaptées au laboratoire.

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

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

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

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

Map fut ainsi isolé dans 6,9% des échantillons (10 sur 144) (Mc Donald, W.L. *et al.* 2003), L'intérêt d'une homogénéisation initiale du lait fut notamment étudié par Grant *et al.* Lors de cette étude, le pasteurisateur utilisé était de type commercial, la contamination initiale allant de 10^1 à 10^5 UFC/ml de lait, avec ou sans homogénéisation.

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

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

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

La plupart des cultures positives qui ont été obtenues dans cette étude correspondent à une température de pasteurisation de 72,5°C, qui correspond pourtant à la température légale minimum de pasteurisation ; sinon, elles proviennent de lait pasteurisé sans homogénéisation préalable.

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

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

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

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

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

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

I.2.5.2.1.2.3. Application particulière au colostrum:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*METHODES DE DIAGNOSTIC ET DE
DEPISTAGE DE LA PARATUBERCULOSE*

II. METHODES DE DIAGNOSTIC ET DE DEPISTAGE DE LA PARATUBERCULOSE

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

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

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

II.1. Diagnostic épidémioclinique

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

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

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

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

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

Toutes les affections qui peuvent provoquer une diarrhée chronique accompagnée ou non d'amaigrissement doivent être envisagées.

Le tableau suivant, qui n'est pas exhaustif, regroupe Les principales affections entrant dans le diagnostic différentiel de la paratuberculose. (Pétrié, L., 1991, Brugere-Picoux, J., 1987)

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

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

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

II.2. Diagnostic nécropsique :

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

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

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

II.3. Examens de laboratoire

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

Les différentes méthodes utilisables peuvent être réparties en 2 groupes :

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

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

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

II.3.1. Techniques directes:

II.3.1.1. Bactérioscopie:

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

II.3.1.1.1. Description et mise en oeuvre:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.3.1.1.2. Caractéristiques:

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

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

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

II.3.1.2. Histopathologie:

II.3.1.2.1. Description et mise en œuvre:

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

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

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

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

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

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

II.3.1.2.2. Caractéristiques:

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

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

II.3.1.3. Culture:

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

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

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

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

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

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

II.3.1.3.1. Coproculture:

II.3.1.3.1.1. Description et mise en œuvre:

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

II.3.1.3.1.1.1. Procédés de décontamination et milieux de culture:

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

Décontamination pendant 24 heures dans une solution à 0,75% de chlorure de cetylpyridinium suivi d'une sédimentation pendant 72 heures (ou centrifugation dans certains cas). Milieu de culture utilisé ensuite : milieu HEY.

Il s'agit de la méthode la plus conventionnelle, utilisée couramment en France par la majorité

des Laboratoires Vétérinaires Départementaux.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

0 : aucune colonie observée

1 : 1 à 9 colonies

2 : 10 à 49 colonies

3 : 50 à 99 colonies

4 : plus de 100 colonies

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

II.3.1.3.1.2. Caractéristiques:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.3.1.3.1.3. Coproculture de mélange

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

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

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

La sensibilité de la méthode apparaît logiquement plus faible pour les lots composés d'animaux faiblement excréteurs (26% et 24% respectivement pour des lots de 5 ou 10 animaux), par rapport à des lots contenant des bovins moyens ou forts excréteurs (sensibilité alors supérieure à 75%).

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

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

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

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

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

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

II.3.1.3.1.4. Méthode radiométrique:

Il existe également une méthode de coproculture dite méthode radiométrique, utilisant le milieu de culture BACTEC-12B, qui est un milieu de culture liquide.

Cette méthode est basée sur la détection de radio-isotopes.

La décontamination des échantillons est réalisée pendant 24 heures dans une solution à 1% de chlorure de cetylpyridinium, associée à une filtration avant ensemencement. en présence de molécules antibiotiques (vancomycine, amphotericine B et acide nalidixique, voire en plus triméthoprim et azlocilline).

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

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

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

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

0 : aucune colonie observée après 12 semaines d'incubation

1 : après plus de 8 semaines d'incubation

2 : entre 6,1 et 8 semaines d'incubation

3 : entre 4,1 et 6 semaines d'incubation

4 : moins de 4 semaines d'incubation

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

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

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

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

Les 2 caprins qui n'étaient détectés que par la culture individuelle excrétaient faiblement

(moins de 2×10^3 *Map*/g de fèces), un autre caprin n'étant détecté qu'à la dilution de 1 pour 10.

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

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

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

II.3.1.3.2. Culture à partir d'échantillons tissulaires

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

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

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

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

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

II.3.1.4. Détection par PCR

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

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

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

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

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

- *ISmav2* (Stommenger, B. *et al.* 2001)

- *HspX* (Ellingson., J.L. *et al.* 1998)
- *F57* (Poupart, P. *et al.* 1993)

Le génome de *Map* (**Figure 8**: souche isolée à partir d'un cas clinique bovin), a été publié en 2005, et consiste en une séquence circulaire unique de 4 829 781 paires de bases, avec une composition G + C de 69,3% (Li, L. *et al.* 2005).

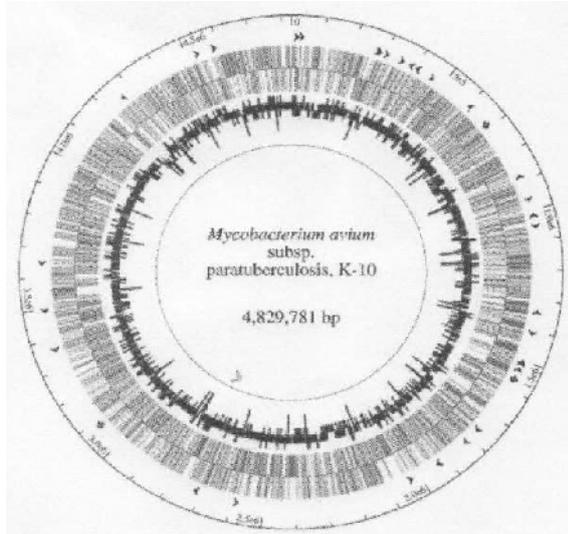


Figure 7 : Représentation circulaire de la souche K-10 de *Map*

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

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

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

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

II.3.1.4.2.1. Description et mise en œuvre

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

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

Certains auteurs affirment néanmoins que les amplicons des séquences *IS900*-like pourraient

aisément être différenciés des amplicons *IS900* de *Map* par la méthode RFLP, qui utilise une étape de digestion par des enzymes de restriction.

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

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

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

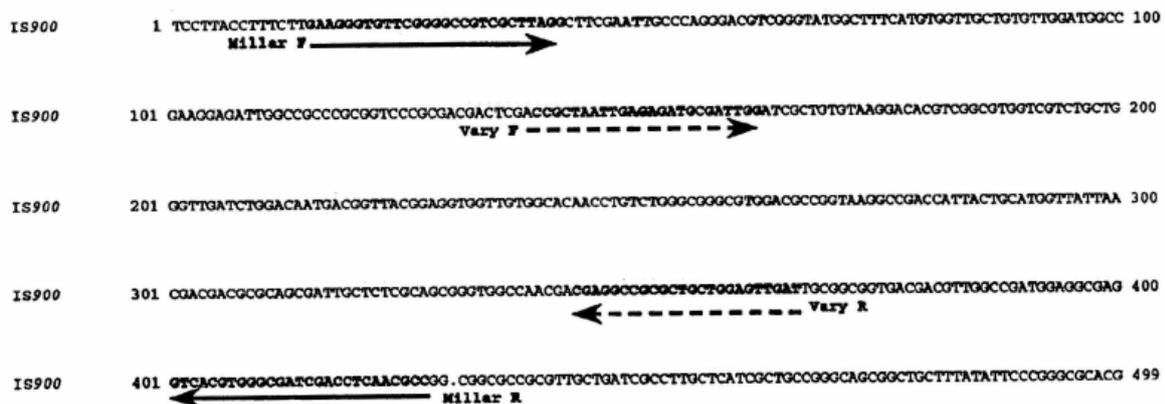


Figure 8: Représentation des amorces de Millar et Vary sur l'extrémité 5' d'*IS900*.

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

II.3.1.4.2.2. Caractéristiques:

La **limite de détection** annoncée est de 5×10^3 UFC/gramme de fèces ; néanmoins, cet objectif est très rarement atteint, et ce pour plusieurs raisons :

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

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

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

Concernant la préparation des échantillons, un traitement par ultrasonication répétée des

prélèvements permettrait de déstructurer les amas de *Map*, augmentant la sensibilité de la technique.

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

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

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

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

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

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

II.3.1.4.3.2. Caractéristiques:

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

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

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

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

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

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

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

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

II.3.1.4.4. PCR multiplexe

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

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

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

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

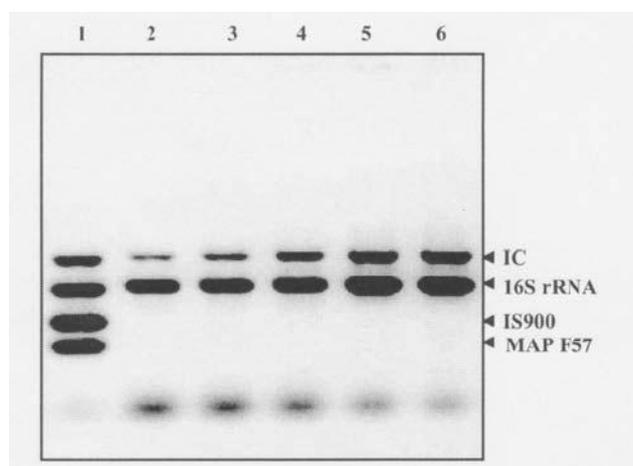


Figure9: Résultat de PCR multiplexe après migration par électrophorèse

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

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

II.3.2. Techniques indirectes:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

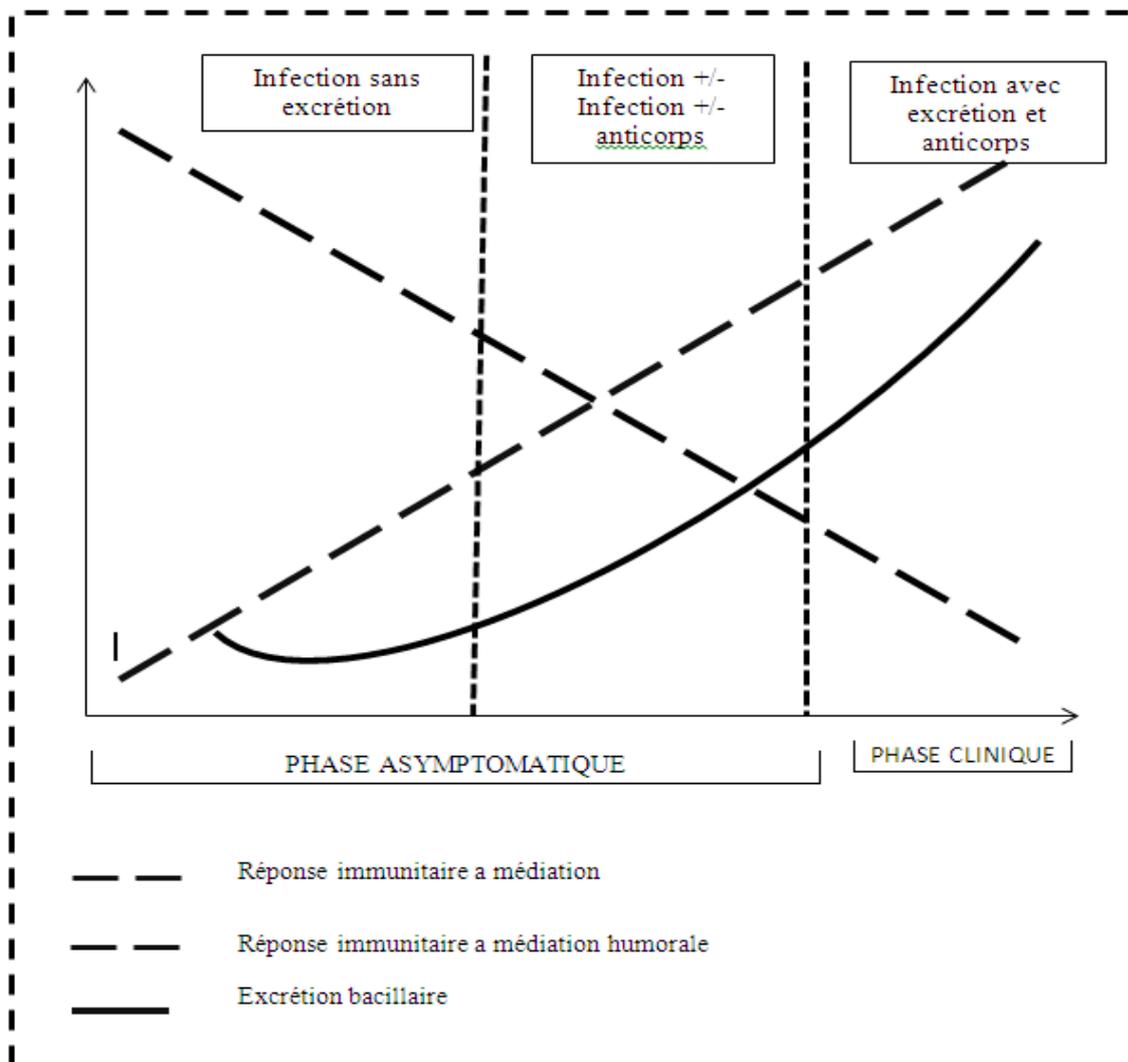


Figure 10 : Evolution des deux composantes de la réponse immunitaire et de l'excrétion.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.3.2.3.1.1. Description et mise en œuvre:

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

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

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

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

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

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

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

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

II.3.2.3.1.2. Caractéristiques

II.3.2.3.1.2.1. IDTc

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

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

II.3.2.3.1.2.2. TCI et test IFN

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

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

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

Dans cette étude, la spécificité des tests est de :

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

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

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

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

de 97,6%.

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

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

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

- Ces deux méthodes sont fortement pénalisées par l'absence d'un antigène réellement spécifique de *Map*, ce qui oblige à multiplier les tests, alors que la spécificité de ces tests devrait être aussi élevée que possible.

- Certains animaux non infectés pourraient avoir une réaction faiblement positive (faux-positifs) pendant quelques semaines suite à l'exposition avec d'autres mycobactéries environnementales, en raison d'une réaction croisée. Ceci est également observé dans le cas de dépistage de la tuberculose bovine.

- Lors de campagne de vaccination contre la paratuberculose (interdite en France à ce jour), des interférences existent, parfois pendant plusieurs années, malgré l'arrêt de la vaccination.

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

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

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

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

- identification des animaux mauvais répondeurs ou anergiques qui ne sont pas capables de produire une réaction immunitaire (stade terminal de paratuberculose, infection par un agent immunosuppresseur)

- vérification que les lymphocytes du sang complet sont encore fonctionnels au moment du test (contrôle des effets du transport et du stockage).

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

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

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

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

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

Nous ne les développerons pas ici.

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

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

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

II.3.2.4.1. Sérologie : méthode ELISA indirecte

II.3.2.4.1.1. Description et mise en œuvre

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

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

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

Après lavage, un anticorps dirigé contre les immunoglobulines de ruminant couplée à une

enzyme est ajouté. Ce conjugué se fixe sur le complexe immun précédemment formé.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tableau 4 : Caractéristiques et qualités des principaux tests ELISA disponibles

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

¹ donnée fournisseur

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

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

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

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

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

Sur le sang :

-ELISA A : HerdCheck® M. Paratuberculosis ELISA, IDEXX laboratories, Inc., Westbrook, Maine ; ELISA “absorbé”

-ELISA B : ParaCheck® ; Prionics, Omaha, Nebraska ; ELISA “absorbé”

-ELISA D : SERELISA ParaTB® ; Synbiotic Corp., San Diego, CA, USA

-ELISA C : ELISA Paratuberculosis ; Institut Pourquier, Montpellier, France. Le kit C étant reconnu et utilisé en France.

Sur le lait :

Spécificité comparée des cinq tests ELISA

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

Tableau 5 : Spécificité des 5 tests ELISA comparés.

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

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

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

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

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

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

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

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

Au fait que l'animal est effectivement infecté, mais excrétaient en dessous des limites de détection de la culture, ou n'excrétait pas le jour du prélèvement

A une simple exposition à *Map sans infection*, entraînant la mise en place d'une immunité, qui n'est pas reliée à l'apparition d'une infection ; par exemple chez un adulte, dont on sait qu'ils sont plus résistants à l'infection (il s'agirait alors d'un « faux-positif »)

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

utilisent des antigènes différents.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La valeur prédictive positive de ce test est acceptable dans les cheptels où la prévalence

de *Map* est modérée à forte, mais elle demeure très faible dans les cheptels dont le nombre d'animaux infectés est très faible.

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

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

Peu à peu, afin de pouvoir utiliser à moindre coût cette méthode lors de dépistage à grande échelle, les différents laboratoires cherchent à développer des sérologies ELISA sur des lots d'animaux (malgré le problème de la trop faible sensibilité à ce jour), mais également sur le lait (dépistage facilité dans les troupeaux laitiers).

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

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

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

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

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

II.3.2.4.1.3.1. Lait individuel:

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

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

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

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

II.3.2.4.1.3.2. Lait de mélange:

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

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

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

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

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

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

Prévalence sérologique au sein du cheptel	Valeur S/P20 %		Valeur S/P 12.5%	
	Sensibilité(%)	Spécificité(%)	Sensibilité(%)	Spécificité(%)
= 1 animal(62)	14	100	35	99
≥ 2 Animaux(54)	24	99	52	96
$\geq 2\%$ (82)	17	99	39	96
$\geq 3\%$ (50)	28	99	85	96
$\geq 4\%$ (32)	38	99	69	94
$\geq 5\%$ (22)	50	99	72	92

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

II.3.2.4.2. Sérologie : immunodiffusion en gélose:

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

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

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

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

II.3.2.4.3. Sérologie : test de fixation du complément

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

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

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

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

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

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

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

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

II.3.2.4.4. Test sérologiques : quelles combinaisons possibles ?

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

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

Pour la paratuberculose, certains auteurs proposent d'utiliser en première intention le test montrant la plus forte sensibilité. Consécutivement à cela, les animaux séropositifs

devront être confirmés par au moins deux des tests les plus spécifiques.

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

II.4. Bilan

II.4.1. Données pour les bovins:

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

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

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

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

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

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

méthode		précocité	spécificité	Sensibilité ¹	Délai de réponse	coût	Application pratique	conclusion
Indirecte, mesure de la réaction immunitaire à médiation cellulaire	Test interférons Gamma	Précoce, avant apparition signes cliniques	26 à 97,6%	21 à 65 % (baisse avec apparition signes cliniques : anergie)	72 heures	?	<ul style="list-style-type: none"> - Dépistage (dont infecté asymptomatiques non excréteurs) - fortes contraintes (temps, conservation) - TCI et IDTc non recommandés et réalisés en pratique 	<ul style="list-style-type: none"> - A associer avec des méthodes sérologiques - peu à pas utilisé à ce jour
Indirecte, mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale	Sérologie ELISA ⁴	intermédiaire	Supérieure à 99,8 %	<ul style="list-style-type: none"> - sensibilité moyenne : 53% (donnée laboratoire) - 9,2% pour les faibles excréteurs - 81,7 % pour les forts excréteurs 	court	3 à 6€	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic clinique (risque d'anergie sérologique) - dépistage collectif, voire individuel, principalement des infectés asymptomatiques excréteurs 	Réalisable à grande échelle dans des délais raisonnables
Indirecte, mesure de la réponse immunitaire à médiation humorale	Fixation du complément	Tardive (confirmation clinique)	spécificité moyenne : 46 à 59% - 72 à 87 % en phase clinique avancée	Inférieure à 50%	Court	4 à 5 €	Confirmer confirmation clinique	Rarement utilisé (remplacement par la sérologie ELISA)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

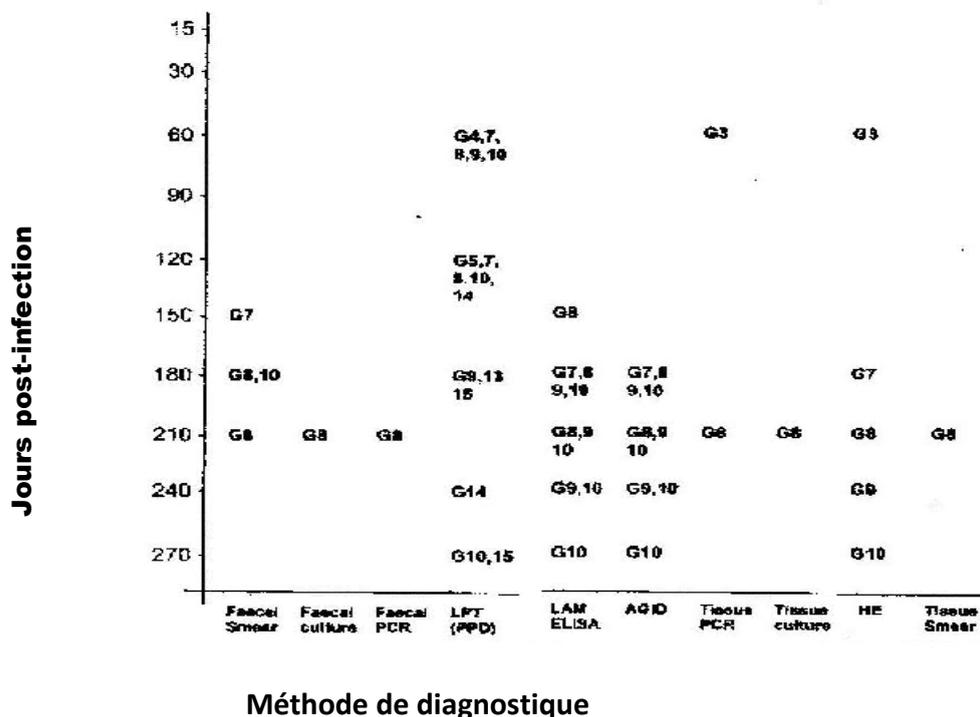
Il peut s'agir de résultats faussement positifs, ou bien ces animaux se sont contaminés au contact des premiers.

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

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

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

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



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

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

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

CONDUIT A TENIR

III-Conduit à tenir

III-1 - Traitement et Prophylaxie

III 1-1 - 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)

III 1-2 – Prophylaxie

III 1-2.1 - 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 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'hygiènes 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)

III 1-2.2 - 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

III 1-2.2.1 - 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.

III 1-2.2.2 - 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

III 1-2.2.3 - 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

III 1-2.2.4 - 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 infectés

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.

PARTIE

EXPERIMENTALE

Notre étude a porté sur l'étude microscopique de 31 échantillons de fragment intestinal (iléocaecale) recueillies a partir de différente espèce (bovin et ovin) au niveau de l'abattoir de Tiaret et 7 échantillons de matière fécale recueillent a partir d'espèce bovin dans le région de Tiaret.

IV: Matériel et Méthode :

IV.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 (leica-RM2125RP)
Formol à 10% de concentré
Eau distillé
Moules métallique
Xylène
Paraffine
Hémateine-éosine
Milieu de Montage synthétique EUKIT
Boite de récolte.
Microscope optique de type paralux.
Bac de benzène.
Lame et porte lame.
Ecouvillon ou un coton monte sur une tige.
L'eau distille.
L'alcool.
Bleu de méthylène.
Fuschine.
L'acide sulfurique.
L'éthanol a 95%.

I V .2-Méthodes:

I V.2.1-Examen macroscopique:

Un examen macroscopique des intestins surtout les segments terminaux de l'intestin grêle (iléon + caecum) à été effectué pour déterminer des lésions en relation avec la paratuberculose. De même, les ganglions lymphatiques mésentériques ont été examinés pour une éventuelle lésion (hémorragie, congestion, hypertrophie ...etc).

I V.2.2-Examen microscopique :

Dans le but d'établir un diagnostic microscopique des fragments intestinaux (iléo-caecaux) et des ganglions lymphatiques prélevés immédiatement après l'abattage des ruminants (ovins et bovin) ont fait l'objet d'une étude histologique après une préparation au niveau du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem selon les étapes suivantes.

I V.2.2.1- Prélèvement et fixation :

Les prélèvements tissulaires ont compris la zone lésée avec une partie du tissu sain de l'intestin et des ganglions lymphatiques correspondants puis fixé dans le formol à 10%.

I V.2.2.2- Clarification :

Cette technique a été réalisée de façon manuelle.

A. 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

B. 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 ».

I V.2.2.3- Confection du bloc :

Les fragments imprégnés de paraffine sont mis dans des moules métallique contenant la paraffine encore chaude. En derniers sont recouverts ensuite par des assettes libellées et placés dans un congélateur.

IV.2.2.4- Microtomie :

Des coupes histologiques minces (5 micromètre) ont été préparées à partir des blocs 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 70% puis transférées dans un bain marie (40°C) pour permettre un bon étalement.

IV.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
7. Colorer pendant 10 minutes à la température de laboratoire dans une solution aqueuse d'éosine.
8. Laver rapidement à l'eau
9. Rincer à l'eau.
10. Plonger les lames successivement dans la 2eme série d'alcool concentration croissantes (80%, 95%, alcool absolu 1, Pui l'alcool absolu 2) pendant 3 minutes pour chaque bain.
11. Mette ces lames dans deux bains de xylène (1 et 2) pendant 1 à 2 minutes pour chacun.

IV.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, permanent 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 couvrant 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 préparés dans l'étuve à 37°C pendant une journée ou plus (jusqu'à la solidification du baume de Canada) (GABE, 1968).

IV.2.2.7 - Observation des coupes histologiques :

On prend des photos à Microscope optique de type (*Paralux*) et à différents grossissements (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 luminal.

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 polynucléaire 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 mononuclées et comptage des granulocytes neutrophiles.

IV.3- Coloration de Ziehl Neelson :

Des frottis de matière fécale sur lame microscopique ont été utilisés pour la technique de coloration Z.

IV.3.1-Préparation des solutions de coloration :

IV 3.1.1: Solution 1 :

Dissoudre 3g de fuschine dans 100ml d'éthanol à 95%.

IV 3.1.2: Solution2 :

Dissoudre 5g de phénol en cristaux dans 100ml d'eau distillée.

Chauffer si nécessaire.

I V 3.1-3: Solution de coloration :

-Mélanger 10ml de solution 1 avec 90 ml de la solution 2 .

-Etiqueter le flacon en mentionner la date de préparation et celle d'expiration sachant que le réactif et conserver 3mois à la température de la salle .

I V 3.1-4 Solution de décoloration.

- Ajouter lentement 3ml d'acide chlorhydrique concentré dans 97ml d'éthanol à 95% .

- Etiqueter le flacon en mentionnant la date de préparation et d'expiration du réactif et conserver 3mois à la température de la salle.

I V 3.1-5 : Solution de contre- coloration :

- Dissoudre 0 3 g de bleu de méthylène dans 100ml d'eau distillée .

- Etiqueter et conserver 3mois à la température de la salle.

I V 3.2- Technique

I V 3.2 .1 : Temps de coloration :

1. Placer la lame sur un support en verre ou en métal et la recouvrir de fuschine phéniquée de Ziehl filtrée.
2. A l'aide d'un coton monté sur une tige trempé dans l'alcool et flambée passer la flamme sous la lame recouverte de fuschine et arrête immédiatement de chauffer des émissions de vapeurs.
3. Laisser agir 3 minutes.
4. Chauffer une deuxième fois puis une troisième fois jusqu'à émission de vapeur en laissant agir à chaque fois pendant 3 minutes
5. Evite l'ébullition et le dessèchement du colorant .Ajouter si besoin de la fuschine au fur et à mesure.
6. A fin du temps de coloration rejeter la fuschine et rincer la lame à l'eau du robinet en évitant de ne pas détacher le frottis (par un jet du robinet trop fort par exemple).

I V 3.2 .2 : Temps de décoloration :

- Recouvrir la lame d'acide sulfurique dilué au quart. Laisser agir pendant 3minute.
- Rincer la lame de la même manière que précédemment.
- Recouvrir la lame avec de l'alcool à95%pendant 5 minutes.
- Rincer à nouveau. Le frottis est alors légèrement teint de rose ou incolore.

N.B : En cas de nécessite le temps de décoloration à l'alcool peut être supprimé et remplacé par une deuxième décoloration à l'acide (1mn).

IV 3.2. 3 : Temps de contre coloration :

- Recouvrir la lame de bleu de méthylène.
- Laisser agir pendant 30 secondes à 1 mn.
- Rincer et sécher à l'air.

IV : Résultats et discussion :

IV.1: Résultat :

Le tableau 9 montre l'incidence de la paratuberculose chez la population des ruminants dans la région de Tiaret et sa distribution selon l'espèce.

Tableau 9 : Incidence de la paratuberculose chez les ruminants :

	Nombre examinés	d'animaux	Nombre de cas positifs (%)
Bovin	03		02 (66 %)
Ovin	28		01 (4 %)

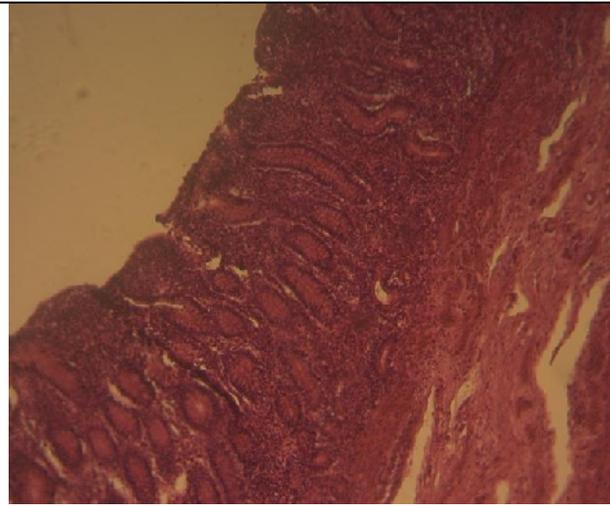


Figure 12 : Aspect normal de l'intestin grêle (iléon) Bovin H&E. 10X ;

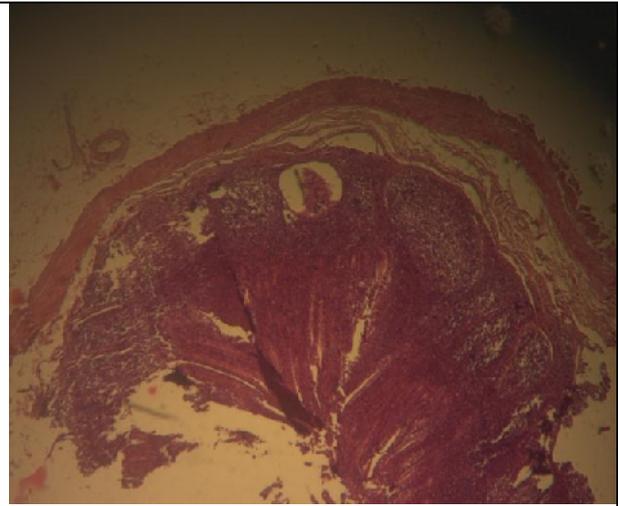


Figure 13 : Hyperplasie lymphocytaires (nodules lymphocytaires) avec épaissement de la paroi intestinale. H&E. 10X.

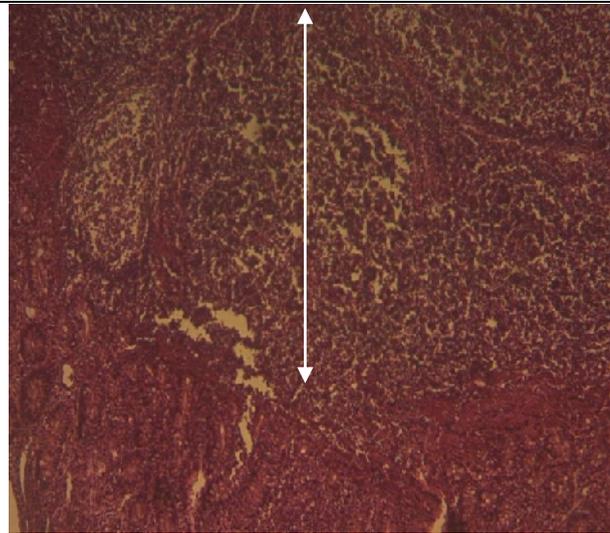


Figure 14 : Hyperplasie lymphocytaires (nodules lymphocytaires) avec épaissement de la paroi intestinale. H&E. 10X.

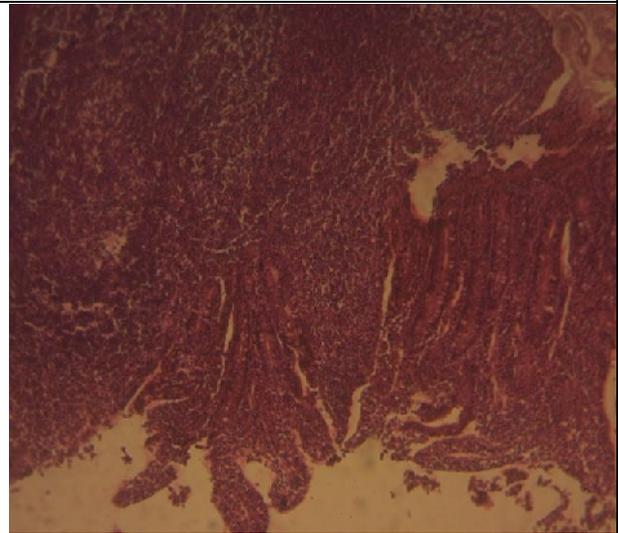


Figure 15 : Projection du nodule lymphocytaire vers la lumière intestinale. H&E. 4 X.



Figure 16 : Projection du nodule lymphocytaire vers la lumière intestinale avec atrophie villositaire. H&E. 10 X.

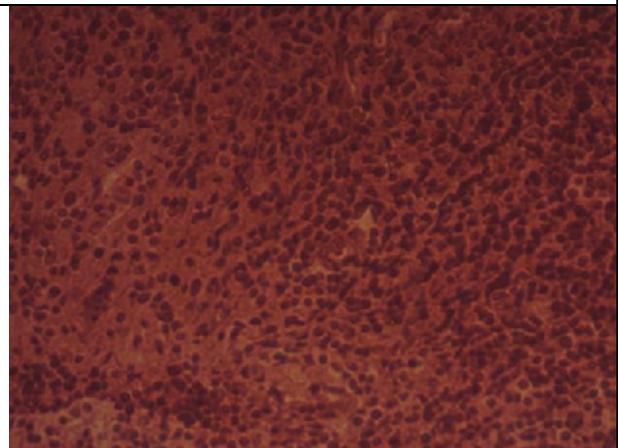


Figure 17 : Granulome inflammatoire prédominé par des cellules épithéloïdes. H&E. 40 X.

IV :Discussion :

La prévalence de la paratuberculose est très variable selon largement sous-estimée (manque d'enquêtes à grande échelle, méthodes de diagnostic et de dépistages employés, volonté de dissimuler la présence de cette affection à des fins les pays, et très probablement commerciales). Elle est donc actuellement fortement sous-diagnostiquée chez les petits ruminants, et les chiffres actuellement disponibles ne reflètent au mieux que la « partie émergée de l'iceberg ».

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

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

Les résultats obtenus récapitulés dans le tableau 09 montre cette variabilité avec une incidence très élevée chez les bovin (66%) en comparaison avec les ovins qui ont représentés un taux très réduit de (4 %). Cette incidence très élevée chez l'espèce bovine est en relation avec le nombre très réduit de cas étudiés qui n'est pas représentatif. Pour l'espèce ovine le taux très faible de 4 % (1 cas entre 28 ovins examinés) obtenu dans notre étude est en corrélation avec les résultats des autres études qui ont montrées que la paratuberculose ovine est généralement moins fréquente que les bovins.

Tous les animaux de cette étude n'ont montrés aucun signe de la paratuberculose et sont considérés comme cliniquement sains. Il a été rapporté qu'à l'intérieur d'un cheptel, l'évolution est généralement lente. La maladie apparaissant d'abord sous forme sporadique avant de devenir très souvent enzootique.

Le taux d'infection dans un troupeau peut aller jusqu'à 70%, le nombre d'animaux en phase clinique de paratuberculose dépassant rarement 10% (entre 3 et 5 % par an en moyenne, voire un peu moins). Il est estimé que 5 à 10 % des infectés latents développent une forme clinique sévère.

Dans un modèle infectieux étudié en 2005 chez les petits ruminants domestiques à l'aide d'une souche ovine de *Map* ; **Begg** et ses collaborateurs ont montrés qu'après neuf mois, 10 animaux ont été positifs en culture fécale, 9 (90%) présentant des lésions histopathologiques, 2 (20%) ayant également des lésions macroscopiques. Sur les 10 animaux

autopsiés à dix mois, 6 montrèrent des lésions macroscopiques s'accompagnant de lésions histopathologiques plus sévères qu'à 9 mois. Ces résultats montrent l'utilité de l'étude histopathologique dans le diagnostic de la paratuberculose.

Les principales lésions microscopiques observées chez les animaux suspectés étaient la présence de macrophages, de cellules épithélioïdes (Figures 17 et 18) contenant des BAAR, à localisation intracellulaire, et compatibles avec la présence de *Map*; certaines cellules épithélioïdes pouvant fusionner et donner des cellules multinuclées géantes appelées cellules de Langhans.

Les macrophages infectés gagnent alors les nœuds lymphatiques régionaux (et donc principalement le nœud lymphatique iléo-caecal), puis se redistribuent vers différents organes. Une réponse inflammatoire granulomateuse dans la muqueuse et la sous-muqueuse intestinales, ainsi qu'à l'atrophie villositaire qui en découle ont été aussi observées dans la présente étude (Figures 14, 16 et 17).

Les résultats de la coloration de sept lames avec la technique de ZN ont montré deux cas positifs avec des bacilles de coloration rouge intra- et extracellulaires.

Les références bibliographiques

ANGUS, K.

Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).
Journal of Comparative Pathology, 1990, **103**, 22-23.

AYELE, W.Y., BARTOS, M., SVASTOVA, P. *et al.*

Distribution of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding-bulls.

Veterinary Microbiology., 2004, **103**, 209-217.

BANROFT, J.D. et STEVENS, A.

Theory and practice of histological techniques, 4th Edition.

Churchill Livingstone, 1996, New-York.

BAO, J., GILLER, P.S. et STAKELUM, G.

Selecting grazing by dairy cows in the presence of dung and the defoliation of tall grass dung patches.

Animal Science, 1998, **66**, 65-73.

BEARD, P.M., DANIELS, M.J., HENDERSON, D. *et al.*

Paratuberculosis infection of non-ruminant wildlife in Scotland.

Journal of Clinical Microbiology, 2001a, **39**, 1517-1521.

BEARD, P.M., RHIND, S., BUXTON, D. *et al.*

Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland.

Journal of Comparative Pathology, 2001b, **124**, 290-299.

BEARD, P.M., STEVENSON, K., PIRIE, A. *et al.*

Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

Journal of Clinical Microbiology, 2001c, **39**, 3080-3084

BEGG, D.J. et GRIFFIN, J.F.T

Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis* : immune parameters and protective efficacy.

Vaccine, 2005a, **23**, 4999-5008.

BEGG, D.J., O'BRIEN, R., MACKINTOSH, C.G. *et al.*

Experimental infection model for Johne's disease in sheep.

Infection and immunity, sept.2005b, **73**, 5603-5611.

BENEDICTUS, G., VERHOEFF, J., SCHUKKEN, Y.H. *et al.*

Dutch paratuberculosis programme history, principles and development.

Veterinary Microbiology, 2000, **77**, 399-413.

BERMUDEZ, L.E., PETROFSKY, M. et GOODMAN, J.

Exposure to low oxygen tension and increased osmolarity enhance the ability of *Mycobacterium avium* to enter intestinal epithelial cells.

Infection and Immunity, 1997, **65**, 3768-3773.

BERNSTEIN, C.N., WANG, M.H., SARGENT, M. *et al.*
Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease.
Journal of Clinical Microbiology, 2007, **45**, 968-971.

BIELANSKI, A., ALGIRE, J., RANDALL, G.C.B. *et al.*
Risk of transmission of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos.
Theriogenology, 2006, **66**, 260-266.

BONNET, J.N., GOUNOT, G., GUERIN, D. *et al.*
Les enjeux de la certification, rapport du groupe de travail relatif à la certification en paratuberculose bovine.
ACERSA, France, 2002, 88 pages.

BOSSHARD, C., STEPHAN, R. et TASARA, T.
Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bull tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows.
J. Food Prot., 2006, **69**, 1662-1667.

BOTTCHER, J., et GANGL A.
Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis – Combined serological testing and classification of individual animals and Herds.

BOURZEIX, T.
Contribution à l'étude épidémiologique de la paratuberculose bovine dans le département du Cher. Mesures prophylactiques envisageables.
Th. : Med. Vet. : Nantes : 1994, 28.07.

BRANT, S.R. *et al.*
MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease.
American Journal of Human Genetics, 2003, **73**, 1282-1292.

BRUGERE-PICOUX, J.
Le diagnostic de la paratuberculose des ruminants.
Recueil de médecine vétérinaire, 1987, **163**, 539-546.

BRUGERE-PICOUX, J., MAILLARD R. et DOUART, A.
Paratuberculose : quels tests de diagnostic utiliser ?
Le Point Vétérinaire, 2001, **201**, 50-53.

BRUMBAUGH, G.W., EDWARDS, J.F., ROUSSEL Jr., A.J. *et al.*
Effect of monensin sodium on histological lesions of naturally occurring bovine paratuberculosis.
Journal of Comparative Pathology, 2000, **123**, 22-28.

BUERGELT, C.D. GINN, P.E.

The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison Bison*).

Veterinary Microbiology, 2000a, **77**, 325-331.

BUERGELT, C.D., LAYTON, A.W., GINN, P.E. *et al.*

The pathology of spontaneous paratuberculosis in North American bison (*Bison bison*).

Veterinary Pathology, 2000b, **37**, 428-438.

BULL, T.J., MCMINN, E.J., SIDI-BOUMEDINE, K. *et al.*

Detection and verification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease.

Journal of Clinical Microbiology, 2003, **41**, 2915-2923.

CHIODINI, R.J. VAN KRUININGEN, H.J

Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis.

Journal of American Veterinary Medicine Association, 1983, **182**, 168-169.

COLLINS, C.H., GRANGE, J.M., YATES, M.D.

Mycobacteria in water.

Journal of Applied Microbiology, 1984, **57**, 193-211.

COLLINS, M.T.

Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Irish Veterinary Journal, 2003, **56**, 565-574.

COLLINS, M.T.

Spreadsheet model for estimating the probability herds are free of paratuberculosis after successive serial tests.

In : Proceedings of the sixth International Colloquium on Paratuberculosis.

Melbourne, Australie, 2000a, 66-75.

COLLINS, M.T. et MORGAN, I.R.

Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program.

Journal of American Veterinary Medicine Association, 1991, **199**, 1724-1729.

COLLINS, M.T., GARDNER, I.A., GARRY, F.B. *et al.*

Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of parauberculosis in cattle in the United States.

Journal of American Veterinary Medicine Association, 2006, **229**, 1912-1919.

COLLINS, M.T., LISBY, G., MOSER, C. *et al.*

Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls.

Journal of Clinical Microbiology, 2000b, **38**, 4373-4381.

COLLINS, M.T., WELLS, S.J., PETRINI, K.R. *et al.*

Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of Bovine paratuberculosis.

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2005, **12**, 685-69

WELLS, S.J. et WAGNER, B.A.

Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in UK dairies and association between familiarity of the herd manager with the diseases or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures.

Journal of American Veterinary Medicine Association, 2000, **216**, 1450-1457.

WELLS, S.J., GODDEN, S.M., LINDEMAN, C.J. *et al.*

Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds.

Journal of American Veterinary Medicine Association, 2003, **223**, 1022-1025.

WELLS, S.J., COLLINS, M.T., FAABERG, K.S. *et al.*

Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dairy cattle.

Clin. Vaccine Immunol., 2006

WHAN L., GRANT, I.R., et ROWE, M.T.

Interaction between *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and environmental protozoa.

BMC Microbiology, 2006, **6**, 63-69.

WHAN, L., GRANT, I.R., BALL, H.J. *et al.*

Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in drinking water.

Lett. Appl. Microbiol., 2001, **33**, 227-231.

WHITTINGTON, R.J, LLOYD, R.J, ET REDDACLIFF, L.A.

Recovery of *Mycobacterium avium susp. paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease.

Veterinary Microbiology, 2001, **81**, 273-279.

WHITTINGTON, R.J., MARSH, I.B. ET REDDACLIFF, L.A.

Survival of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in dam water and sediment.

Applied and environmental microbiology, 2005, **71**, 5304-5308.

WHITTINGTON, R.J., MARSH, I.B., TAYLOR, P.J. *et al.*

Isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis.

Australian veterinary Journal, 2003, **81**, 559-563.

WHITTINGTON, R.J., MARSHALL, D.J., NICHOLLS, P.J. *et al.*

Survival and dormancy of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in the environment.

Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**, 2989-3004.

WHITTINGTON, R.J., REDDACLIFF, L.A., MARSH, I. *et al.*

Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in sheep with Johne's disease.

Australian Veterinary Journal, 2000, **78**, 34-37

WILLIAMS, E.S., SPRAKER, T.R. et SCHOONVELD, G.G.
Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado.
Journal of Wildlife Diseases, 1979, **15**, 221-227.

YAMASAKI, K. *et al.*
Single nucleotide polymorphisms in *TNFSF15* confer susceptibility to Crohn's disease.
Human Molecular Genetics, 2005, **14**, 3499-3506.

ZWICK, L.S., WALSH, T.F., BARBIERS, R. *et al.*
Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*).
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2002, **14**, 326-32

RESUME

La paratuberculose est une maladie infectieuse chronique d'origine bactérienne, Contagieuse, inoculable qui affecte les ruminants, est considérée comme une maladie d'actualité du fait de l'importance des pertes économiques qu'elle engendre et de sa distribution mondiale.

La paratuberculose touche les bovins, les petits ruminants et les ruminants sauvages. L'étude histologiques des échantillons intestinaux et de ganglions lymphatiques de 31 ruminants (28 ovins ,03 bovins) prélevés après abattage au niveau de l'abattoir de Tiaret, a montrée la présence des lésions compatibles avec la paratuberculose chez 02 vaches (**66 %**) et 01 (**4 %**) mouton. Les lésions principales étaient une hyperplasie lymphocytaires (nodules lymphocytaires) avec épaissement de la paroi intestinale, une projection du nodule lymphocytaire vers la lumière intestinale avec atrophie villositaire en et un granulome inflammatoire prédominé par des cellules épithéloïdes.