



HAL
open science

**Excrétion de *Mycobacterium avium* ssp.
paratuberculosis dans le lait chez la vache laitière : étude
descriptive et facteurs de risque dans 6 élevages**

Estelle Gonzalez

► **To cite this version:**

Estelle Gonzalez. Excrétion de *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis dans le lait chez la vache laitière : étude descriptive et facteurs de risque dans 6 élevages. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-04483919

HAL Id: dumas-04483919

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04483919v1>

Submitted on 29 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

EXCRETION DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS* DANS LE LAIT CHEZ LA VACHE LAITIÈRE : ETUDE DESCRIPTIVE ET FACTEURS DE RISQUE DANS SIX ELEVAGES

THÈSE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

GONZALEZ Estelle, Marine

Directeur de thèse : M. Fabien CORBIÈRE

JURY

PRESIDENTE :
Mme Caroline LACROUX

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Fabien CORBIÈRE
M. Gilles FOUCRAS

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

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

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la reproduction*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme TRUMEL Catherine, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie vétérinaire*
- M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et thérapeutique*
- M. MAILLARD Renaud, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
- M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
- Mme DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme MEYNADIER Annabelle, *Alimentation animale*
- M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme PAUL Mathilde, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. RABOISSON Didier, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la reproduction*
- Mme BIBBAL Delphine, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et toxicologie*
- M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
- Mme PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
- M. VOLMER Romain, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
- Mme BRET Lydie, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme BOUH SIRA Emilie, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. CARTIAUX Benjamin, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
- Mme DANIEL S Héléne, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme DAVID Laure, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. DIDIMO IMAZAKI Pedro, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. DOUET Jean-Yves, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme FERRAN Aude, *Physiologie*
- Mme GRANAT Fanny, *Biologie médicale animale*
- Mme JOURDAN Géraldine, *Anesthésie, analgésie*
- M. JOUSSERAND Nicolas, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme LALLEMAND Elodie, *Chirurgie des équidés*
- Mme LAVOUE Rachel, *Médecine Interne*
- M. LE LOC'H Guillaume, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
- Mme MILA Hanna, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction*
- M. VERGNE Timothée, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme WARET-SZKUTA Agnès, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. AUMANN Marcel, *Urgences, soins intensifs*
- M. AUVRAY Frédéric, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. CASSARD Hervé, *Pathologie des ruminants*
- M. CROVILLE Guillaume, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme DEBREUQUE Maud, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme DIDIER Caroline, *Anesthésie, analgésie*
- Mme DUPOUY GUIRAUTE Véronique, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme GAILLARD Elodie, *Urgences, soins intensifs*
- Mme GEFFRE Anne, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme GRISEZ Christelle, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme JEUNESSE Elisabeth, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme PRESSANTI Charline, *Dermatologie vétérinaire*
- M. RAMON PORTUGAL Félipe, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. REYNOLDS Brice, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme ROUCH BUCK Pétra, *Médecine préventive*

REMERCIEMENTS

A mon Jury de thèse :

A Madame la Professeure Caroline LACROUX

*Professeur de l'enseignement supérieur Anatomie pathologique et animaux d'élevage
Directrice de l'enseignement et de la vie étudiante*

Qui me fait l'honneur après avoir accompagnée notre promotion tout au long de son cursus, d'accepter la présidence de ce Jury de thèse.

Mes hommages les plus respectueux.

A Monsieur le Docteur Fabien CORBIERE,

*Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des Ruminants,*

Pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses enseignements, son encadrement et son aide précieuse et sa confiance durant ce projet.

Pour tout le temps et la confiance accordée,

Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS,

*Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des Ruminants,*

Pour son implication, ses conseils et son expertise lors de la réalisation de ce travail et des complications rencontrées,

Sincères remerciements.

SOMMAIRE

Remerciements	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	11
Introduction	13
1) Définition.....	13
2) Eléments d'épidémiologie.....	13
3) Etiologie	13
3.1 Caractéristiques de <i>Map</i>	14
3.2 Conséquences	14
3.3 Métabolisme	15
3.4 Génome K-10	15
3.5 Séquences d'intérêt dans l'identification et le diagnostic de <i>Map</i>	15
4) Pathogénicité	15
4.1 A l'échelle moléculaire.....	15
4.2 Introduction de la PTB à l'échelle des troupeaux.....	15
4.3 Contamination du bovin sain.....	16
4.4 Colonisation de l'organisme.....	16
4.5 Bovin infecté versus bovin clinique	17
5) Histopathologie	18
5.1 Catégorie 1 : Lésions focales (Figures 5-6).....	18
5.2 Catégories 2 : Lésions multifocales (Figure 6).....	18
5.3 Catégorie 3 : Lésions diffuses	18
5.3.1 Catégorie 3.a : Lésions diffuses multi bacillaires (Figure 7).....	19
5.3.2 Catégorie 3.b : Lésions diffuses lymphocytaires (Figure 8).....	19
5.3.3 Catégorie 3.c : Lésions diffuses intermédiaires (Figure 9).....	19
6) Tableau clinique et diagnostic	20
6.1 Stade I : Subclinique et non excrétoire.....	20
6.2 Stade II : Subclinique et excrétoire.....	20
6.3 Stade III : Clinique et excrétoire	21
7) Impact économique	21
7.1 Pertes directes.....	21
7.2 Pertes indirectes.....	21
7.3 Estimation des pertes engendrées en France : exemple du modèle épidémiologique dynamique de Duffour, Pouillot et Durand, 2004 (Figure 10)	22
8) Traitement et lutte	22
9) Potentiel zoonotique	23
10) Rôle de l'alimentation lactée dans la transmission de MAP	24
11) Exposition du consommateur	25

12) Détection de <i>Map</i> dans le lait	26
Contexte et objectifs de l'étude	27
I. Matériel et méthode.....	28
1. Population d'étude.....	28
1.1. Elevages.....	28
1.2 Programme de vaccination dans le cadre d'un plan de maîtrise (https://gdsreseau3m.com/) .	28
1.3 Effectif de prélèvement et échantillons sélectionnés.....	29
2. Evaluation de l'excrétion de <i>Map</i> par qPCR.....	30
2.1 Evaluation de l'excrétion sur lait entier.....	30
2.2 Evaluation de l'excrétion sur culot cellulaire	31
3. Analyse des données	35
II. Résultats	36
1. qPCR sur lait entier	36
2. qPCR sur culot cellulaire : ensemble des échantillons testés	36
1.1 Echantillons positifs	36
1.2 Bovins positifs.....	37
1.2 Analyse univariable de l'influence des différents facteurs sur l'excrétion de <i>Map</i> dans le lait	37
3. Analyse de l'effet des différents facteurs de risque potentiel : analyse multivariées.....	42
III. Discussion	43
1. Schéma d'étude	43
2. Limites liées au choix de la population d'étude	43
3. Protocole de détection de <i>Map</i> dans le lait.....	45
4. Résultats	46
4.1. Prévalence de l'excrétion de <i>Map</i> dans le lait	46
4.2. Statut excréteur laitier.....	47
4.3. Influence du taux cellulaire	47
IV. Conclusion.....	49
Bibliographie.....	51
Annexe 1 : Protocole qPCR adiagène adapté.....	57

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES :

FIGURE 1: CARTE DE LA REPARTITION MONDIALE DE LA PARATUBERCULOSE EN 2017, OIE.....	13
FIGURE 2: PHYLOGENIE DES MYCOBACTERIES (BASEE SUR SEQUENCE RIBOSOMALE 16S) D'APRES RAPPORT PARATUBERCULOSE DES RUMINANTS AFFSA, 2009.	14
FIGURE 3: DEVENIR DE MAP DANS L'ORGANISME D'UN BOVIN APRES INGESTION. (« ARSENAULT ET AL. - 2014 - FROM MOUTH TO MACROPHAGE MECHANISMS OF INNATE IMM.PDF », S. D.)	17
FIGURE 4: CLASSIFICATION DICHOTOMIQUE DES ANIMAUX EXPOSES A MAP A L'AIDE D'UNE APPROCHE DIAGNOSTIQUE SYSTEMATIQUE ET STRUCTUREE (WHITTINGTON ET AL., 2017).....	18
FIGURE 5: LESION FOCALE - COUPE D'UN GRANULOME - ECHELLE : BARRE= 50 MM (NOEUD LYMPHATIQUE D'UN BOVIN).....	19
FIGURE 6: LESIONS MULTIFOCALES - GRANULOMES DE MACROPHAGE (FLECHE) OU REGROUPEMENT DE CELLULES GEANTES (ACCENT CIRCONFLEXE) - ECHELLE: BARRE= 80 MICRONS (COUPE D'INTESTIN GRELE DE BOVIN).....	19
FIGURE 7: LESIONS DIFFUSES MULTIBACILLAIRES -INFILTRATION INFLAMMATOIRE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE PAR DES MACROPHAGES- ECHELLE: BARRE= 100 MICRONS (COUPE D'INTESTIN GRELE DE BOVIN).....	20
FIGURE 8: LESIONS DIFFUSES LYMPHOCYTAIRES -INFILTRATION INFLAMMATOIRE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE PAR DES LYMPHOCYTES- ECHELLE: BARRE= 60 MICRONS (COUPE D'INTESTIN GRELE DE BOVIN).....	20
FIGURE 9: LESIONS DIFFUSES INTERMEDIAIRES -INFILTRATION INFLAMMATOIRE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE PAR DES LYMPHOCYTES ET MACROPHAGES- ECHELLE : BARRE= 100 MICRONS (COUPE D'INTESTIN GRELE DE BOVIN).....	20
FIGURE 10: TABLEAU ESTIMANT LES COUTS ENGENDRES PAR L'INTRODUCTION DE LA PARATUBERCULOSE EN CHEPTEL ALLAITANT ET LAITIER (DUFFOUR, POUILLON ET DURAND, 2004).	22
FIGURE 11: CARTE DE LA CONSOMMATION MONDIALE DE PRODUIT LAITIER PAR HABITANT ET PAR AN (SAUF BEURRE).....	25
FIGURE 12: PHOTOS DE LA CAPTURE MAGNETIQUE DE MAP PAR BILLES ELECTROMAGNETIQUES	31
FIGURE 13: SCHÉMA DU PRINCIPE DE LA PCR EN TEMPS RÉEL, <i>WANG-SHICK RYU, WANG-SHICK RYU, CHAPTER 4 - DIAGNOSIS AND METHODS, EDITOR(S): WANG-SHICK RYU, MOLECULAR VIROLOGY OF HUMAN PATHOGENIC VIRUSES, ACADEMIC PRESS, 2017, PAGES 47-62, ISBN 9780128008386</i>	33
FIGURE 14: REGRESSION LINEAIRE $CT=F(\text{LOG}(\text{IS900}))$ REALISEE A PARTIR DE LA GAMME DE DILUTION D'ADN PURIFIE DE LA SOUCHE K10.....	34
FIGURE 15: REPARTITION DES CYCLES DE SORTIES QPCR DES BOVINS AVEC UNE ALTERATION DE L'INTEGRITE DE LEUR MAMELLE	39
FIGURE 16: CYCLE DE SORTIE PCR DES BOVINS VACCINES POSITIFS A MAP DANS LE LAIT EN FONCTION DE LEUR STADE DE LACTATION.....	40
FIGURE 17: CYCLE DE SORTIE PCR DES BOVINS NON VACCINES POSITIFS A MAP DANS LE LAIT EN FONCTION DE LEUR STADE DE LACTATION.	41

TABLEAUX :

TABLEAU 1: INCIDENCE SEROLOGIQUE ANNUELLE VIS A VIS DE LA PARATUBERCULOSE SUR LES CAMPAGNES DE PROPHYLAXIE DE 2014 A 2017 DANS LES 8 ELEVAGES PARTICIPANTS A L'ETUDE. CALCUL A PARTIR DES RESULTATS OBTENUS PAR PROPHYLAXIE SANITAIRE ANNUELLE.....	28
TABLEAU 2: NOMBRE D'ECHANTILLON RETENUS PAR ELEVAGE ET PAR CAMPAGNE DE PRELEVEMENT	29
TABLEAU 3: REPARTITION DES ECHANTILLONS PAR ELEVAGE SELON LE STATUT VACCINAL, LE STATUT EXCRETEUR FECAL ET LE TAUX CELLULAIRE DU LAIT DES VACHES.....	30
TABLEAU 4: REPARTITION DES VACHES PRELEVEES PAR ELEVAGE SELON LEUR STADE DE LACTATION ET LEUR STATUT VACCINAL	30
TABLEAU 5: MOYENNE DES CT ET COEFFICIENTS DE VARIATION OBTENUS POUR LES PRINCIPAUX POINTS DE LA GAMME DE DILUTION D'ADN PURIFIE DE LA SOUCHE K10.....	33
TABLEAU 6: RESULTATS DE QPCR SUR LAIT ENTIER.....	36
TABLEAU 7: EQUIVALENT BACTERIENS ASSOCIES AUX VALEURS DE CT	36
TABLEAU 8: CHARGE BACTERIENNE DES ECHANTILLONS POSITIFS.	36
TABLEAU 9: REPARTITION DES BOVINS POSITIFS PAR ELEVAGE.....	37
TABLEAU 10: RESULTATS GLOBAUX.....	37
TABLEAU 11: EFFECTIFS DES ECHANTILLONS POSITIFS SELON LEUR STATUT VACCINAL.....	37
TABLEAU 12: EFFECTIFS DES BOVINS POSITIFS SELON LEUR STATUT VACCINAL.....	37
TABLEAU 13: EFFECTIFS DES ECHANTILLONS POSITIFS EN PCR LAIT SELON LE STATUT EXCRETEUR FECAL DES VACHES.....	38
TABLEAU 14: EFFECTIFS DES BOVINS POSITIFS EN PCR LAIT SELON LEUR STATUT EXCRETEUR FECAL	38
TABLEAU 15: STATUT PCR LAIT VIS A VIS DE MAP SELON LE STATUT EXCRETEUR FECAL CHEZ LES BOVINS VACCINES.....	38
TABLEAU 16: STATUT PCR LAIT VIS A VIS DE MAP SELON LE STATUT EXCRETEUR FECAL CHEZ LES BOVINS NON VACCINES.....	38
TABLEAU 17: EFFECTIFS DES ECHANTILLONS POSITIFS EN PCR LAIT SELON LEUR TAUX CELLULAIRE LAITIER	38
TABLEAU 18: EFFECTIFS DES BOVINS POSITIFS EN PCR LAIT SELON LEUR TAUX CELLULAIRE LAITIER	39
TABLEAU 19: STATUT PCR LAIT VIS A VIS DE MAP SELON LE TAUX CELLULAIRE DU LAIT CHEZ LES VACHES VACCINEES.....	39
TABLEAU 20: STATUT PCR VIS A VIS DE MAP SELON LE TAUX CELLULAIRE DU LAIT CHEZ LES VACHES NON VACCINEES.....	39
TABLEAU 21: REPARTITION DES ECHANTILLONS ET BOVINS POSITIFS SELON LE STADE DE LACTATION	40
TABLEAU 22: REPARTITION DES BOVINS VACCINES SELON LE MOIS EN LAIT DEPUIS LE DERNIER VELAGE (MEL).....	40
TABLEAU 23: REPARTITION DES BOVINS NON VACCINES SELON LE MOIS EN LAIT DEPUIS LE DERNIER VELAGE (MEL)	41
TABLEAU 24: REPARTITION DES ECHANTILLONS ET BOVINS POSITIFS EN PCR LAIT SELON L'AGE AUQUEL ILS ONT ETE VACCINES	41
TABLEAU 25: INFLUENCE DU STATUT SEROLOGIQUE SUR L'EXCRETION DE MAP DANS LE LAIT CHEZ LES BOVINS VACCINES.....	42
TABLEAU 26: INFLUENCE DU STATUT SEROLOGIQUE SUR L'EXCRETION DE MAP DANS LE LAIT CHEZ LES BOVINS NON VACCINES	42
TABLEAU 27: TAUX CELLULAIRES DES VACHES DEFINIES COMME AYANT UN HAUT TAUX CELLULAIRE DANS LE LAIT.....	44
TABLEAU 28: DATE DES PRELEVEMENTS PAR RAPPORT AUX DIFFERENTS CONTROLES LAITIERS.....	44

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACERSA : Association pour la certification de la santé animale en élevage

AFB : Bactéries acido-résistantes

Ct : Cycle seuil à un instant t

GDS : Groupement de Défense Sanitaire

GTV : Groupement Technique Vétérinaire

LSA: Loi de santé animale européenne 2021

Mav: *Mycobacterium avium ssp. avium*

MAP: *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*

Mb: Mégabase

Mce: Mammalian cell entry

Mtb: *Mycobacterium avium ssp tuberculosis*

ORF : Open Reading Frame, ou cadre de lecture, partie du cadre de lecture susceptible d'être traduit en protéine ou peptide.

PCR : Polymerase Chain Reaction

PhMS : Phagomagnetic separation

PTB : Paratuberculose bovine

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

INTRODUCTION

1) Définition

La paratuberculose (PTB), ou « Maladie de Johne » est une maladie infectieuse des ruminants. Elle est causée par *Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis (Map)* (Sweeney et al., 2012). Les signes cliniques chez les bovins sont dominés par une diarrhée aqueuse et profuse et un amaigrissement pouvant aller jusqu'à la cachexie (Whittington et al., 2017).

C'est une maladie de catégorie E en Europe, c'est-à-dire soumise à surveillance et à déclaration obligatoire¹. Il n'y a pas de plan de lutte national en vigueur en France (Occitanie, 2021).

2) Eléments d'épidémiologie

La paratuberculose est présente sur l'ensemble des continents. A l'heure actuelle elle est enzootique dans plusieurs pays dont la France (Fanelli, 2020). La présence de la PTB a par ailleurs été démontrée au sein de la faune sauvage de ses pays frontaliers (chez les cervidés, suidés, caprinés, ovinés et camélidés sauvages).

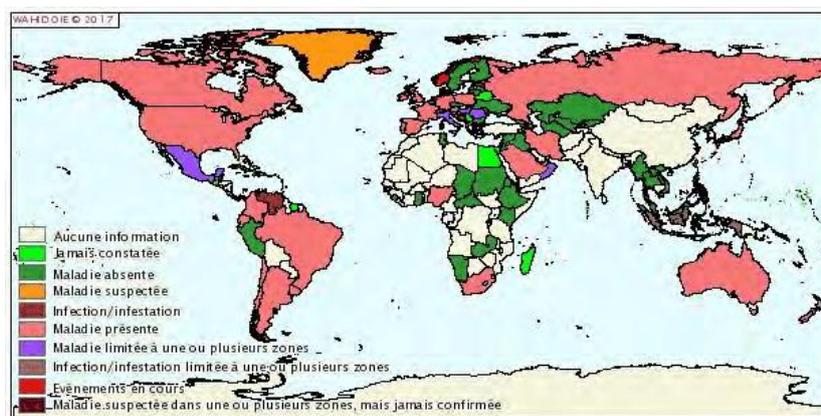


Figure 1: Carte de la répartition mondiale de la paratuberculose en 2017, OIE.

En 2009, la prévalence réelle de la PTB au sein des cheptels bovins européens et français est estimée à environ 20%. (Nielsen et al., 2009). L'ensemble des études réalisées restent partielles.

Aux Etats-Unis la prévalence de la PTB est plus importante au sein des ateliers laitiers (1 à 20%) qu'au sein des troupeaux allaitants (moins de 5%) (Lombard, 2011).

3) Etiologie

L'agent responsable de la PTB est *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (Map)*, également appelé bacille de Johne (Harris et Barletta, 2001).

Il appartient au genre *Mycobacterium*, unique genre de la famille des mycobactéries, elles-mêmes de l'ordre des Actinomycétales (Payeur, 2014). Le genre *Mycobacterium* contient deux grands groupes : les mycobactéries à croissance rapide (isolats environnementaux non pathogènes) et les mycobactéries à croissance lente. Parmi ces mycobactéries on relève la présence d'espèces pathogènes avérées tels que *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium tuberculosis* (Harris et Barletta, 2001).

L'espèce *Mycobacterium avium* comprend quatre sous espèces de bactéries intracellulaires dont *Map*, qui se distingue phénotypiquement par sa dépendance à la mycobactine et génétiquement par la présence en plusieurs exemplaires du gène IS900 (Harris et Barletta, 2001).

¹ Loi de la santé animale (LSA) de 2021

A l'échelle moléculaire, à partir du gène IS1311, il est possible de différencier deux souches de *Map* (Sevilla, Garrido, Gejo et Juste, 2007). Les souches bovines dites souches C (pour Cattle) et les souches ovines dites S (pour Sheep, retrouvées également chez les caprins). On suppose que cette séparation de *Map* en deux lignées fut la conséquence d'une adaptation plus spécifiquement aux hôtes respectifs avec le temps (Harris et Barletta, 2001). Chez les espèces sauvages (cerfs et sangliers), les souches identifiées se rapprochent davantage des souches C (Sevilla et al., 2007).

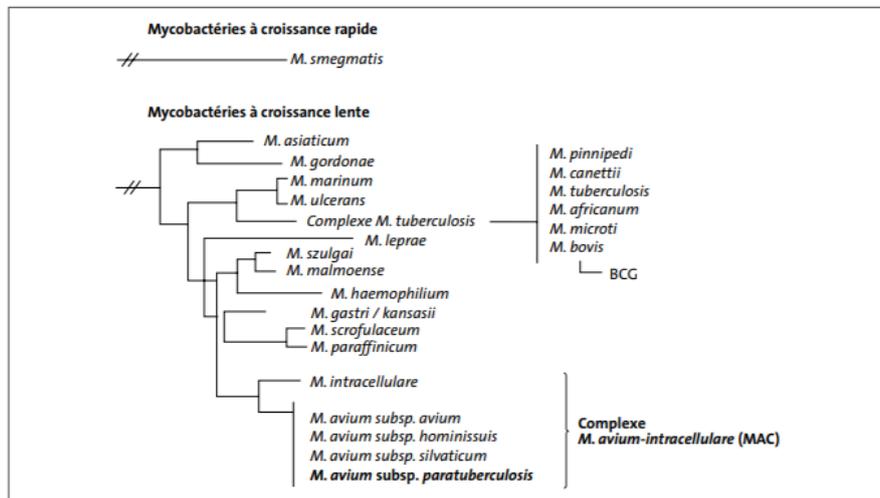


Figure 2: Phylogénie des mycobactéries (basée sur séquence ribosomale 16S) d'après rapport Paratuberculose des Ruminants Affsa, 2009.

3.1 Caractéristiques de *Map*

Le bacille de Johne est une bactérie intracellulaire stricte, aérobie, Gram positif, immobile, non capsulée et non sporulée. Il est considéré de petite taille ($0.5 \times 1.5 \mu\text{m}$). Ses propriétés acido-alcoolo résistante et hydrophobe lui proviennent de sa paroi lisse, épaisse, riche en lipides comme celles des cellules eucaryotes (Ayele et al., 2005). Elle est composée à 60% par des acides mycoliques et contient également des peptidoglycanes reliés entre eux par de l'arabinogalactane (Rathnaiah et al., 2017).

On suppose que cette similitude de composition pariétale confère à *Map* un avantage majeur pour coloniser les cellules et échapper au système immunitaire de son hôte (Li et al., 2005).

Map peut produire et utiliser un vaste panel de lipides pour son propre métabolisme. Cette propriété lui confère de grandes capacités d'adaptation à son environnement en comparaison à d'autres mycobactéries (80 fois supérieures à celle de *Mycobacterium tuberculosis*) (Li et al., 2005).

3.2 Conséquences

Le bacille de Johne est capable selon les conditions de son environnement de perdurer pendant plusieurs mois à années dans le lisier, le sol, les sédiments et l'eau (Richard et al., 2004). Il peut produire des biofilms sur les matériaux de construction et les équipements mais il lui est difficile d'en constituer avec l'eau, l'acier inoxydable et le plastique. (Singh et al., 2013).

Il est résistant à de nombreux agents chimiques et physiques (Rathnaiah et al., 2017) mais reste sensible au formol 5%, à l'eau de Javel 10% et au sulfate de cuivre 5% (Kralik, et al., 2014). Une étude a montré qu'un an de vide sanitaire ne suffisait pas à un assainissement complet d'un milieu contaminé par *Map* (Moravkova et al., 2012). Cette persistance serait également favorisée par un portage des protozoaires, nématodes et insectes (Singh et al., 2013).

3.3 Métabolisme

La croissance de *Map* est lente avec un turn-over d'environ 20h (Rathnaiah et al., 2017) pour une température optimale de 37°C (Ayele et al., 2005). Elle dépend de la mycobactine² que le bacille ne peut synthétiser, il doit donc le trouver dans son environnement.

Le bacille de Johne est capable de réaliser la glycolyse, la voie du pentose phosphate, le cycle de l'acide tricarboxylique et du glyoxylate. En revanche il ne peut réaliser le cycle de l'urée (Li et al., 2005).

3.4 Génome K-10

C'est un chromosome circulaire dont la taille est comprise entre 4.4 et 4.7 Mb, comprenant 69.3% de bases de guanine et cytosine. Les 91.5% du génome sont codant avec 4350 ORF représentant 52.5% des gènes codés selon la même polarité.

Le chromosome possède un unique opéron codant pour un ARN Ribosomal (Li et al., 2005), en revanche aucun plasmide endogène n'a encore été rapporté (Harris et Barletta, 2001). Environ 1.5% du génome de *Map* est composé de répétition de séquences.

3.5 Séquences d'intérêt dans l'identification et le diagnostic de *Map*

La séquence la plus utilisée est celle du gène IS900³ (présente en 14 à 18 exemplaires selon les isolats).

Les autres séquences d'intérêt sont les séquences IS1311 (7 exemplaires) IS_MAP02 et IS_MAP04 (respectivement en 6 et 4 exemplaires). Ces deux dernières ne présentent pas d'homologues chez les autres mycobactéries. Des correspondances et similitudes sont en revanche rapportées chez *Legionella pneumophila*, *Arthrobacter nicotinovorans* et *Streptomyces Coelicolor*.

Les protéines immunoréactives du génome ne sont pas utilisées pour l'identification de *Map* car elles sont communes à d'autres mycobactéries (Harris et Barletta, 2001).

4) Pathogénicité

4.1 A l'échelle moléculaire

Il existe peu d'information sur la pathogénie de *Map* à l'échelle moléculaire. Un déficit en protéines de la famille des PE/PPE est observé (comme chez *Mav* et *Mycobacterium leprae*). Ces protéines jouent un rôle antigénique notable dans le déclenchement de la réponse immunologique.

Les conséquences exactes de ces observations sont à l'heure actuelle inconnues, mais leur absence suggère que la réponse immunitaire de l'individu infecté sera variable et limitée. Les vaccins et antimicrobiens dirigés contre cette protéine seraient inefficaces pour la lutte contre *Map*.

Map est un agent pathogène facultatif. Il est capable d'exprimer des gènes de manière sélective (pour survivre à la phagocytose des macrophages par exemple). Il serait aussi capable d'exprimer des facteurs de virulence pour infecter de manière permanente un hôte. Parmi ces facteurs, 8 sont homologues au gène mammalien cell entry (*mce*). Ce gène est aussi présent chez *Mtb*, *Mav*, *Mycobacterium bovis* et chez des mycobactéries non pathogènes. On ne peut donc pas le considérer comme le facteur initiant de la maladie (Li et al., 2005).

4.2 Introduction de la PTB à l'échelle des troupeaux

La PTB est une maladie dite d'achat. Un élevage se contamine la plupart du temps par introduction d'un animal infecté. Le rôle de la faune sauvage semble négligeable.

² Molécule de faible poids moléculaire sécrétée par les bactéries et permettant le transport du fer au sein des cellules. Cet élément est essentiel à de nombreuses enzymes métaboliques

³ Les séquences IS sont des séquences d'insertion, c'est-à-dire une séquence génétique courte transposable (Mahillon et Chandler, 1998).

4.3 Contamination du bovin sain

Un bovin se contamine majoritairement durant son premier mois de vie le plus souvent par voie oro-fécale. Les sources principales sont les fèces, l'environnement souillé par les fèces. Une contamination par les aérosols est aussi démontrée. Une transmission pseudo-verticale, via le colostrum et le lait, apparaît plus probable pour les vaches malades (Eisenberg et al, 2011). Expérimentalement la dose orale minimale pour infecter un veau est d' 1.5×10^6 UFC⁴ (Sweeney et al., 2006). Passé un mois d'âge, la fermeture de la gouttière œsophagienne permet l'arrivée directe des liquides directement dans la caillette. Cette particularité diminuerait les capacités de contamination de *Map* (Guilhermet et al, 1975).

L'individu en croissance semble développé une résistance vis-à-vis de *Map*. Le risque d'infection au-delà de 4 mois à 1 an d'âge est fortement réduit. Une contamination à l'âge adulte reste cependant possible mais la charge bactérienne et la période d'exposition nécessaires sont nettement supérieures (Arsenault et al., 2014). L'origine précise de cette plus grande sensibilité du jeune n'est pas déterminée. Les hypothèses principales se basent sur deux éléments de la leur physiologie :

- La perméabilité digestive aux immunoglobulines pendant les premières heures de vie
- L'immaturation de la réponse immunitaire adaptative (Sweeney, 2011).

Les transmissions in utero sont également possibles (Arsenault et al., 2014). Cependant, chez les vaches infectées, la présence de *Map* se retrouve chez 40% des fœtus issues de vaches au stade clinique et chez seulement 18% des fœtus de vaches infectées asymptomatiques (Sweeney, 2011).

Enfin, des études récentes ont montré que la contamination horizontale entre veaux, liée à une excréation fécale précoce, est non seulement possible mais contribuerait à la persistance de l'agent infectieux au sein du troupeau (Corbett et al., 2019).

4.4 Colonisation de l'organisme

Elle s'effectue très majoritairement au niveau de l'iléon et des plaques de Peyer par opsonisation grâce à une protéine d'encrage, la fibronectine (Figure 3, étape 5). Une infection au niveau des cryptes des amygdales a été démontrée expérimentalement lors d'utilisation de fortes doses d'inoculation. Il est alors supposé que les bactéries rejoignent les nœuds lymphatiques mésentériques et l'iléon par voie hématogène ou lymphatique (Figure 3, étape 4).

Pour un individu immunocompétent, c'est-à-dire un bovin de plus de 4 mois à 1 an, la réponse adaptative se met en place et les macrophages éliminent la bactérie par phagocytose (Figure 3, étape 6). En revanche, pour les individus plus jeunes, *Map* envahit les macrophages sous-épithéliaux et perturbe la formation de phagosomes. D'autres mécanismes complémentaires sont suspectés (insertion de lipides bactériens au sein de la membrane des phagolysosomes pour inhiber leur fusion par exemple).

⁴ UFC : Unité Formatrice Colonie

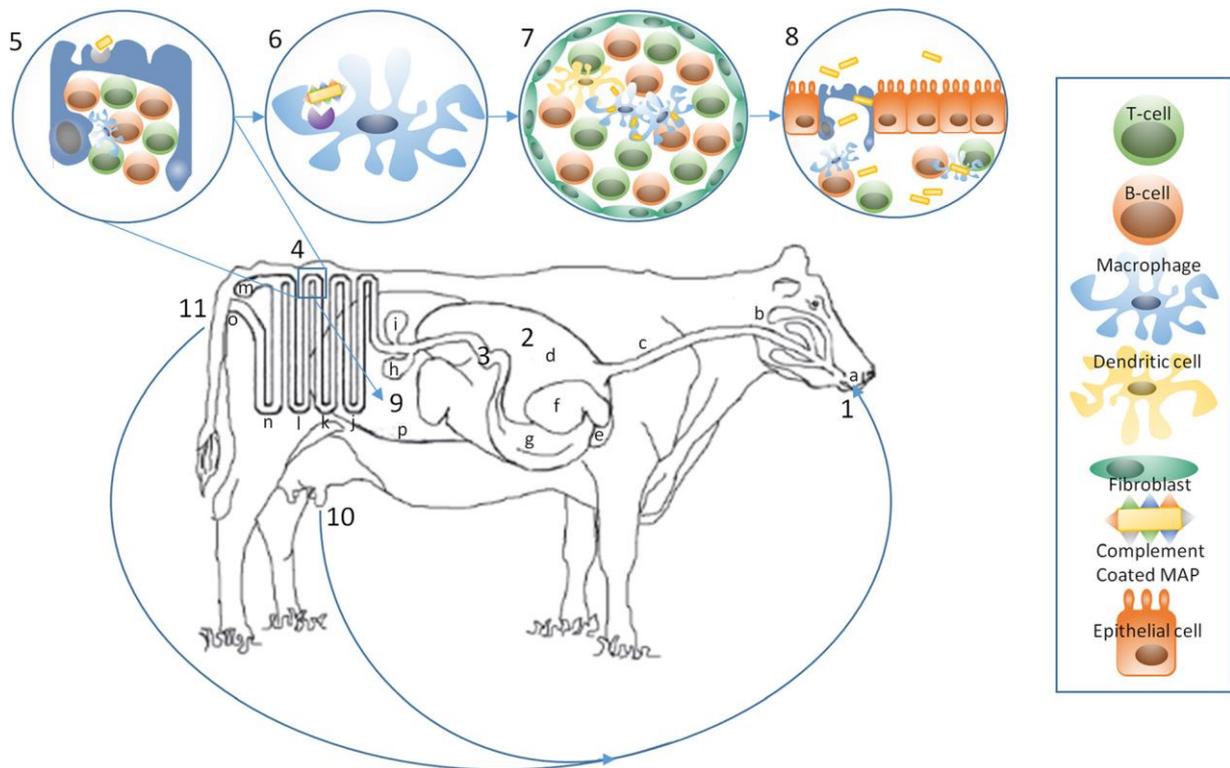


Figure 3: Devenir de Map dans l'organisme d'un bovin après ingestion. (« Arsenault et al. - 2014 - From mouth to macrophage mechanisms of innate imm.pdf », s. d.)

4.5 Bovin infecté versus bovin clinique

Seulement 10 à 15% des individus exposés développent une forme clinique. La majeure partie des veaux lutteraient donc efficacement face à l'infection.

Le statut d'un individu suite à son exposition à *Map* dépendrait en partie de facteurs génétiques. Ce déterminisme semble polygénique (Sweeney et al., 2006). Des études ont montré un coefficient d'héritabilité de la PTB de 0.1. Plusieurs loci sont impliqués dans les différences de sensibilité des individus à la PTB. Ils sont contenus dans 8 chromosomes (1, 6, 7, 13, 16, 21, 22, 23). D'autres loci contenus dans les chromosomes 1, 12 et 15 seraient quant à eux protecteurs vis-à-vis de la PTB (Minozzi et al., 2012). Une récente étude menée en France a identifié 3 régions sur les chromosomes 12, 13 et 23 en race Prim'Holstein et 1 région sur le chromosome 23 pour la race Normande, correspondant aux gènes *ABCC4* (chromosome 12), *CBFA2T2* (chromosome 13), and *IER3* (chromosome 23), comme très significativement liées à l'infection et l'expression clinique de la maladie (Sanchez et al. 2020).

Les différents statuts d'un bovin vis-à-vis de la PTB sont résumés dans la Figure 4 (Whittington et al., 2017).

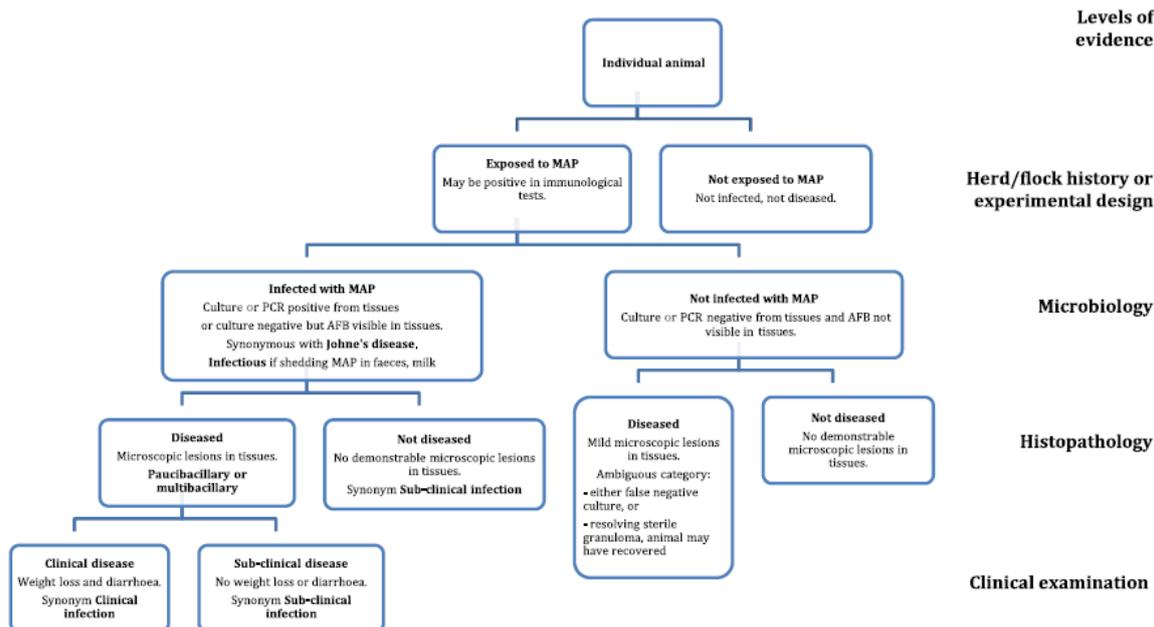


Figure 4: Classification dichotomique des animaux exposés à Map à l'aide d'une approche diagnostique systématique et structurée (Whittington et al., 2017).

5) Histopathologie

Les lésions causées par une infection à *Map* ont été classées en 5 catégories (González et al.) :

5.1 Catégorie 1 : Lésions focales (Figures 5-6)

Ce sont des granulomes bien délimités localisés au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques (iléon et jéjunum) et du tissu lymphoïde de la muqueuse de l'iléon distal. Ils contiennent en majorité des macrophages (5 à 30 par granulome) avec un cytoplasme mousseux, pâle, et un noyau de chromatine. Le rapport nucléocytoplasmique élevé. Les noyaux peuvent également être polynucléés.

On peut également retrouver quelques lymphocytes et des cellules géantes. La présence de bactérie acido-résistantes (AFB) a été montrée par immunohistochimie mais elles sont peu identifiables par méthode de Ziehl-Neelsen.

5.2 Catégories 2 : Lésions multifocales (Figure 6)

On retrouve la même localisation que la catégorie précédente avec en plus des granulomes présents au sein de la lamina propria de l'intestin grêle et des nœuds lymphatiques iléo-caecaux. Les granulomes, plus nombreux sont similaires aux précédents.

Au sein des villosités de l'intestin (au niveau de l'apex), on retrouve des cellules géantes de Langhans⁵ entourées d'un fin infiltrat lymphocytaire et plasmocytaire.

A ce stade l'architecture de l'intestin n'est pas modifiée, il n'y a pas non plus d'entérite diffuse. Les AFB sont sporadiques.

5.3 Catégorie 3 : Lésions diffuses

Des infiltrations inflammatoires dans plusieurs régions de l'intestin sont observées. A ce stade les animaux présentent une entérite granulomateuse. L'architecture de l'intestin est modifiée.

Trois sous-catégories sont définies selon la nature des cellules présentes et de la proportion d'AFB.

⁵ Cellules de Langhans : cellules formées par la fusion de nombreuses cellules épithélioïdes qui mettent en commun leurs cytoplasmes, leurs noyaux sont disposés en couronne ou en fer à cheval (<https://www.histology.be/atlas/HG/general/right/HG-Con-CEtr.htm>).

5.3.1 Catégorie 3.a : Lésions diffuses multi bacillaires (Figure 7)

Les muqueuses, sous muqueuses et parfois musculaires de l'intestin (jéjunum à caecum) sont infiltrées par de nombreux macrophages (caractéristiques communes aux précédentes catégories). La muqueuse s'épaissit et les villosités intestinales fusionnent entre elles.

Des lymphocytes et cellules géantes sont également observés. *Map* est présente en grande quantité.

Ces lésions s'accompagnent d'œdème, de vascularites avec la formation de thrombi et des lymphadénites.

5.3.2 Catégorie 3.b : Lésions diffuses lymphocytaires (Figure 8)

Les lésions au niveau des séreuses et sous-muqueuses se concentrent entre le jéjunum et l'iléon. Elles sont moins sévères que dans la catégorie précédente. Les granulomes sont identifiables mais l'architecture de la muqueuse est sévèrement modifiée.

Les lymphocytes sont prédominants mais on retrouve également quelques macrophages et des cellules géantes.

La présence de *Map* est sporadique.

5.3.3 Catégorie 3.c : Lésions diffuses intermédiaires (Figure 9)

Les lésions sont localisées au niveau du jéjunum et de l'iléon. Elles sont très variables d'un individu à l'autre. L'architecture de l'intestin n'est pas forcément modifiée.

La muqueuse est envahie à la fois par de nombreux lymphocytes, des cellules géantes et des macrophages. Des granulomes isolés sont présents.

Map est identifiée chez tous les individus de cette catégorie mais en quantité intermédiaire.

Les lésions s'accompagnent d'œdème, de thrombi au niveau des vaisseaux, et chez certains animaux des infiltrations lymphocytaires au niveau des cellules nerveuses.

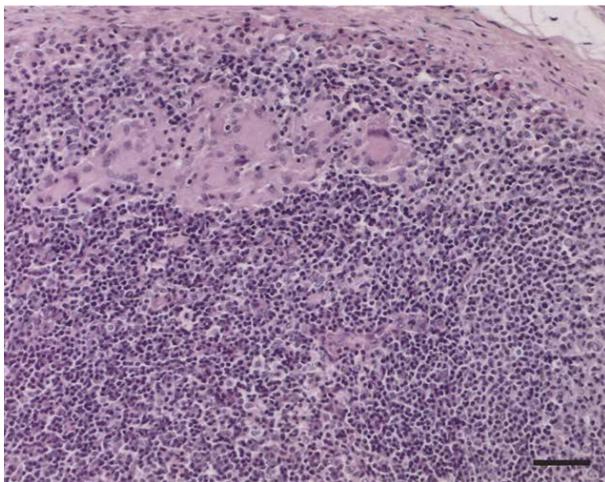


Figure 5: Lésion focale - Coupe d'un granulome - Echelle : barre= 50 µm (Noeud lymphatique d'un bovin)

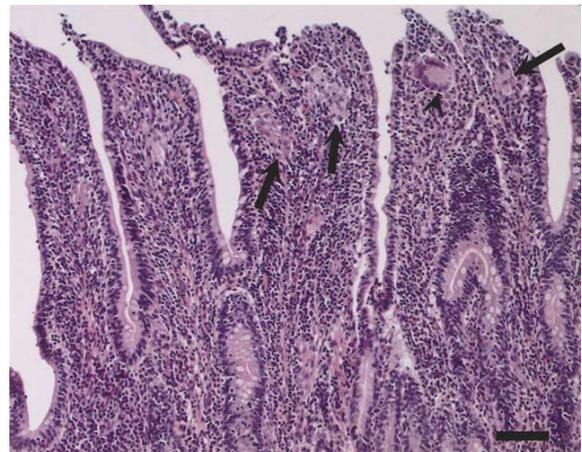


Figure 6: Lésions multifocales - granulomes de macrophage (flèche) ou regroupement de cellules géantes (accent circonflexe) - Echelle : Barre= 80 microns (Coupe d'intestin grêle de bovin)

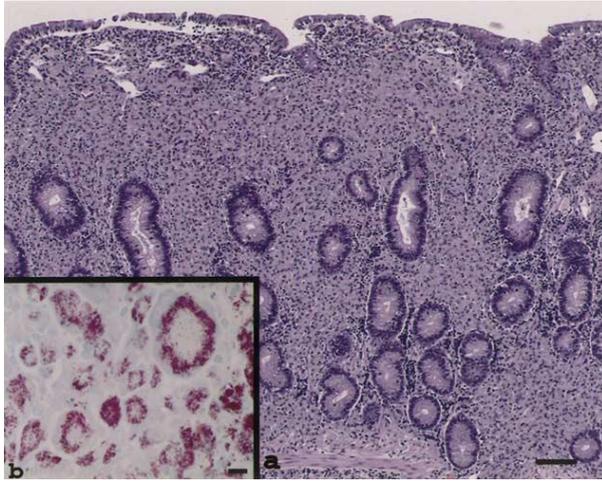


Figure 7: Lésions diffuses multibacillaires -Infiltration inflammatoire de la muqueuse intestinale par des macrophages- Echelle: Barre= 100 microns (Coupe d'intestin grêle de bovin)

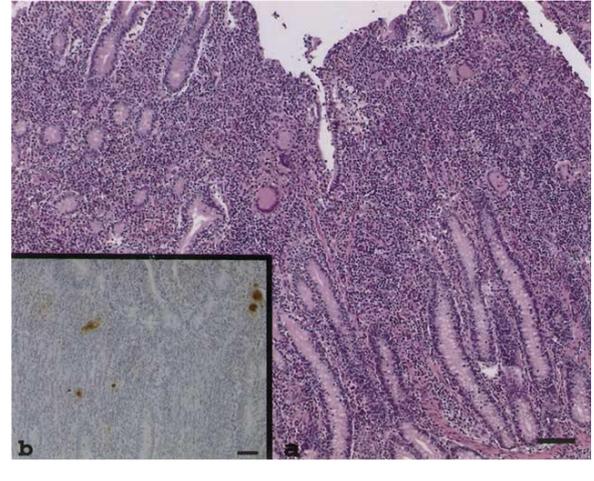


Figure 8: Lésions diffuses lymphocytaires -Infiltration inflammatoire de la muqueuse intestinale par des lymphocytes- Echelle : Barre= 60 microns (Coupe d'intestin grêle de bovin)

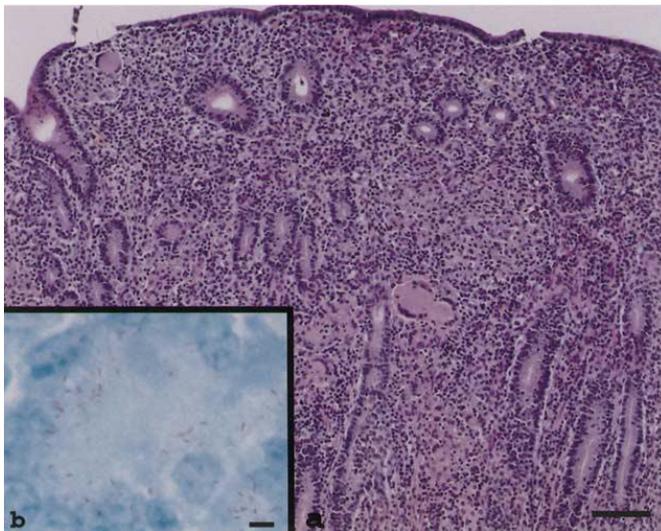


Figure 9: Lésions diffuses intermédiaires -Infiltration inflammatoire de la muqueuse intestinale par des lymphocytes et macrophages- Echelle : Barre= 100 microns (Coupe d'intestin grêle de bovin)

6) Tableau clinique et diagnostic

Trois stades se succèdent (Cocito et al., 1994) :

6.1 Stade I : Subclinique et non excrétoire

Ce stade est de durée variable mais généralement supérieure à deux ans (Sweeney et al., 2011). L'hôte met en place une réponse immunitaire de type cellulaire. Cette réponse diminue ensuite petit à petit pour être remplacée par une réponse humorale non protectrice (Stabel et al., 1998).

En termes de diagnostic, la sérologie semble la plus indiquée. Cependant la plupart du temps la production d'anticorps ne sera pas suffisante avant la phase d'excrétion fécale.

6.2 Stade II : Subclinique et excrétoire

Durant cette phase, la quantité de mycobactéries dans la muqueuse et la lumière intestinale augmente. Même si aucun signe clinique n'est présent une baisse de la production laitière et des performances de

reproduction peuvent être des signes d'appels. Néanmoins, ils demeurent non spécifiques et difficilement percevables par l'éleveur (Sweeney et al., 2011).

La détection d'anticorps par ELISA est possible mais sa sensibilité est extrêmement faible (entre 15 to 57%). La détection précoce de la maladie est donc difficile par cette technique (Stabel et al., 1998). L'utilisation de culture sur fèces est une méthode bien plus sensible, soit 60% (capacité de détection de 50 bactéries/g de fèces) (« Stabel - 1998 - Johne's Disease A Hidden Threat.pdf », s. d.). C'est le test diagnostic standardisé de référence pour ce stade (Collins et al., 2006). La PCR sur fèces, tout aussi, voire plus sensible que la culture et plus rapide à mettre en œuvre est aussi possible.

On peut également diagnostiquer *Map* dans les échantillons de lait.

6.3 Stade III : Clinique et excrétoire

Il survient 6 mois à des années après la phase subclinique excrétoire.

Le bovin présente une diarrhée profuse et aqueuse, un amaigrissement sévère alors que l'appétit est conservé. Ces signes progressent vers la déshydratation, la cachexie et la mort de l'animal.

On peut également avoir de l'œdème par hypoprotéïnémie. Les performances diagnostiques des approches indirectes (sérologies) et directes (culture ou PCR sur fèces) sont bien meilleures à ce stade même si des faux négatifs sont observés en début de cette phase (Sweeney et al., 2011).

7) Impact économique

Il n'existe pas d'étude d'estimation chiffrée des pertes économiques engendrées par la PTB dans les élevages laitiers français. L'hétérogénéité des systèmes de production permet difficilement la transposition des résultats obtenus dans d'autres pays (Dufour et al., 2004).

Plusieurs études par modélisation dynamique ont tenté d'approcher ces pertes qui sont présentées ci-dessous (Rasmussen et al., 2021).

7.1 Pertes directes

Elles sont liées à la faible espérance de vie des bovins malades et à la diminution de la production laitière des vaches infectées (de 4 à 20%) (Lombard, 2011 ; Ozsvari et al., 2020 ; Mc. Aloon et al., 2016). L'importance de cette perte de production est variable selon le stade d'évolution de l'infection et majeur au stade clinique. L'augmentation du rang de lactation semble également avoir un impact négatif sur la probabilité de survie du bovin clinique.

Les individus séropositifs présentent également une sensibilité accrue aux mammites cliniques et subclinique dès la seconde lactation (hausse significative du nombre de cellules somatiques du lait) (Rossi et al., 2017). Une baisse de l'immunité globale est également suggérée. Pour ce qui est de la qualité du lait, les études sur un lien entre l'infection à *Map* et les teneurs en matières grasses et protéiques du lait divergent (Ozsvari et al., 2020).

La PTB détériore également les performances de reproduction des bovins avec une augmentation de l'intervalle inter-vêlage, une cyclicité des primipares retardée, la dégradation de la fertilité et de la fécondité (Ozsvari et al., 2020).

La plus faible valorisation bouchère des animaux infectés et l'euthanasie des animaux malades sont aussi à prendre en compte dans les pertes directes (Raizman et al., 2009).

7.2 Pertes indirectes

Les pertes indirectes comprennent un renouvellement plus important du cheptel, les dépistages répétés en vue d'assainir le troupeau, les soins aux animaux cliniques, la mise en place de mesures de biosécurité et de prévention (éviter l'infection des jeunes : maintien de la propreté de l'aire paillée, achat de colostrum et de lait de remplacement).

7.3 Estimation des pertes engendrées en France : exemple du modèle épidémiologique dynamique de Duffour, Pouillot et Durand, 2004 (Figure 10)

Les résultats sont basés sur l'introduction d'une génisse infectée au sein d'un troupeau indemne en début de simulation. On distingue les ateliers laitiers et allaitants en tenant compte des animaux cliniques et subcliniques.

Le modèle estime une diffusion de la PTB plus rapide en cheptel laitier. Les conséquences économiques y sont plus lourdes (4 fois plus importantes qu'en cheptel allaitant) avec une augmentation linéaire des pertes. En élevage allaitant les pertes suivent une dynamique plus aléatoire.

Au terme des 15 années, 4 fois plus de cas (cliniques et subcliniques) sont dénombrés en cheptel laitier. Pour les animaux cliniques les coûts comprennent : la visite du vétérinaire, l'utilisation d'un traitement anti-diarrhéique, le test de confirmation en laboratoire, la perte d'une vache clinique et de ses filles, la diminution du profit par litre de lait manquant.

Pour les animaux subcliniques, le modèle prend uniquement en compte la baisse de production laitière.

Table III. Estimated disease costs in a mean French beef herd and in a mean French dairy herd.

Year	Mean French beef herd			Mean French dairy herd		
	Clinical cases ^a	Sub-clinical cases ^a	Disease costs (€)	Clinical cases ^a	Sub-clinical cases ^a	Disease costs (€)
1	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0
2	0.00	0.00	0	0.40	0.60	1 052
3	0.40	0.60	762	0.27	0.13	585
4	0.32	0.16	615	0.68	1.11	1 839
5	0.00	0.13	0	0.86	0.89	2 086
6	0.55	0.92	1 043	1.40	2.03	3 658
7	0.82	0.88	1 569	2.05	2.53	5 143
8	0.34	0.45	649	2.90	3.88	7 407
9	0.77	1.46	1 473	4.00	5.20	10 156
10	1.59	2.05	3 031	5.11	6.74	13 028
11	1.27	1.56	2 424	6.21	8.25	15 843
12	1.42	2.46	2 697	7.07	9.53	18 112
13	2.59	3.76	4 932	7.66	10.53	19 709
14	2.91	3.84	5 538	8.02	11.23	20 724
15	2.90	4.49	5 519	8.21	11.71	21 318

^a Number of animals.

Figure 10: Tableau estimant les coûts engendrés par l'introduction de la paratuberculose en cheptel allaitant et laitier (Duffour, Pouillot et Durand, 2004).

8) Traitement et lutte

En France, un programme de maîtrise national basé sur le volontariat a été mis en place depuis 1999 (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2009). Il repose sur la détection et la réforme précoce des animaux excréteurs d'une part, et la maîtrise sanitaire des risques de contamination d'autre part.

Les facteurs de risques sont :

- Un contact prolongé du veau avec sa mère et son environnement
- La mauvaise gestion du fumier, de l'eau et de l'alimentation
- Une pression d'infection importante : rythme de gestion des effluents
- Une facilitation de l'échappement du système immunitaire : parasitisme concomitant, équilibre nutritionnel, etc.

D'après le modèle de Camanes, et al., (2018), l'efficacité d'un plan de lutte dépendrait de la prévalence de la maladie au sein du troupeau. Dans chaque scénario, le levier de lutte le plus efficace s'est révélé être la diminution d'exposition du veau à l'environnement maternel. La réforme précoce des animaux détectés positif par test ELISA permet également une diminution de l'incidence de la maladie au sein des troupeaux. Pour les cheptels avec une prévalence plus importante de *Map*, une augmentation de la fréquence des dépistages améliore l'efficacité du plan de lutte.

L'ACERSA⁶ a mis en place un programme de certification des cheptels, cependant du fait d'un coût de réalisation élevé ce programme ne s'est pas généralisé. En France, elle tient compte uniquement des résultats d'analyses (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2009).

Le traitement des animaux cliniques est illusoire. In vitro, les antibiotiques efficaces contre *Map* incluent la cyclosérine, l'isoniazide, la rifampicine et l'éthambutol. Aucun d'entre eux ne possède une AMM vétérinaire, ils ne sont donc pas utilisables sur animaux de rente. In vivo l'antibiothérapie ne permet pas de guérison de l'animal (Harris et Barletta, 2001).

Depuis 2014, le vaccin Silirium® a obtenu une autorisation de mise sur le marché en France. Il contient une bactérie entière inactivée. En France, son utilisation est possible dans le cadre d'un plan de maîtrise. Les restrictions d'accès à ce vaccin s'expliquent par la diminution de la spécificité des mesures de dépistages de la tuberculose bovine. Ainsi, le nombre de faux positif aux intradermo tuberculisation passerait de 0.75% à plus de 20% (D'après avis ANSES Saisine n°2012-SA-0198).

9) Potentiel zoonotique

La maladie de Crohn touche environ 200 000 à 220 000 personnes en France contre 1.4 million en Amérique du Nord (McNees et al., 2015). Elle fait partie des ALD⁷(Observatoire National des MICI, 2015).

La maladie du Crohn cause un ensemble de lésions inflammatoires chroniques sur les muqueuses du tractus digestif. Elles peuvent être granulomateuses et/ou ulcératives et se localisent préférentiellement au niveau de l'intestin sur la totalité de l'épaisseur de la muqueuse.

Ces lésions se traduisent par les symptômes suivants : douleurs abdominales, diarrhée plus ou moins hémochésie ou méléna, obstructions intestinales et perte de poids. Cette similarité des symptômes de la maladie de Crohn et de la PTB interroge sur la possible implication de *Map* en tant qu'agent étiologique de la maladie de Crohn (McNees et al., 2015). Cette hypothèse est appuyée par les caractéristiques génomiques et morphologiques de la bactérie. De plus, la séquence IS900 a été isolée dans des échantillons de sang et de tissus de patients humains atteints de cette maladie. Des bactéries du genre *Mycobacterium* ont également pu être cultivées à partir de tissus de patient atteint de la maladie de Crohn. La culture de *Map* fut possible non pas à partir de tissu mais de macrophages sanguins périphérique et de lait maternel.

Map ayant été retrouvé dans des échantillons sanguins de patients sains vis-à-vis de la maladie de Crohn, une exposition large de la population est suggérée (McNees et al., 2015). Le bacille de Johne ayant été retrouvé dans des produits laitiers et poudres de lait commercialisés (Gerrard et al., 2018 ; Botsaris et al., 2016). Sa résistance à la pasteurisation fait de l'industrie laitière une source de contamination probable à surveiller (Shankar et al., 2010 ; Kuenstner et Kuenstner, 2021). Les autres sources d'exposition potentielles sont l'eau, le sol, l'environnement, les plantes et la viande (Payeur, 2014).

Cette découverte n'infirme pas l'hypothèse de départ étant donné que des formes subcliniques de PTB sont retrouvés dans 90% des animaux séropositifs. La sortie de latence de l'agent infectieux pourrait

⁶ ACERSA : Association de Certification de la Santé Animale, dissoute le 31 décembre 2016, mais dont l'ensemble de missions est dorénavant repris par l'Association Française Sanitaire et Environnementale (AFSE), créée par FREDON France et GDS France

⁷ ALD : Affections à longue durée, maladie grave, chronique, nécessitant des soins long (>6mois) et coûteux.

être favorisée par des stress environnementaux, des facteurs génétiques et une sensibilité individuelle plus importante.

Néanmoins, des similitudes ne sont pas suffisantes pour établir un lien de causalité (McNees et al., 2015).

10) Rôle de l'alimentation lactée dans la transmission de MAP

Un sevrage tardif est associé à une augmentation du risque pour le jeune de devenir par la suite séropositif à *Map* (Goodger et al., 1996). Contrairement au statut sérologique de la mère qui lui, n'influence pas celui de sa descendance dans la mesure où l'environnement est déjà contaminé (Eisenberg, et al., 2015). L'environnement des bovins pendant leurs premiers mois de vie a donc un lien direct avec leur inoculation de la bactérie (Doré et al., 2012). L'alimentation est un des facteurs à considérer (Nielsen, et al., 2008).

Si l'alimentation lactée ne constitue pas de risque en elle-même, l'administration de lait ou de colostrum contaminé augmente le risque d'infection des jeunes (Nielsen et al., 2008). Les bovins porteurs de *Map*, peuvent excréter la bactérie dans le lait quel que soit leur statut clinique. Les expérimentations menées par Sweeney et al en 1992, ont mis en évidence la présence de *Map* en faible concentration dans des échantillons de vaches infectées, soit 2 à 8 UFC pour 50mL de lait. Lorsqu'on ramène cette concentration à la quantité de lait bue par un veau quotidiennement on augmente rapidement la dose bactérienne journalière (10% du poids vif, selon « Les bases de l'alimentation du veau », s. d.) (Sweeney, et al., 1992).

Par ailleurs, nourrir les veaux avec les déchets de lait de vaches à mammites traitées par antibiotiques est une pratique largement répandue. Aucune étude randomisée n'a mis en évidence d'impact sur la transmission de la PTB et la santé du jeune. Elle en reste déconseillée du fait du risque d'augmenter les antibiorésistances (Abb-Schwedler et al., 2014). Beaucoup d'études se contredisent mais en l'absence de certitude il apparaît important de sécuriser les pratiques d'alimentation des veaux à défaut de supprimer les pratiques à risque (Aust et al., 2013). L'étude de Nielsen et al, montre qu'alimenter les veaux avec le mélange du lait de plusieurs vaches augmente significativement le nombre d'individus séropositifs à *Map* par la suite. Toujours selon cette étude, un taux cellulaire élevé dans le lait distribué pourrait également favoriser l'inoculation de la bactérie.

La pasteurisation pourrait réduire l'exposition à *Map* même si elle ne permet pas une stérilisation complète du lait vis-à-vis de la bactérie (Stabel, 2008). Le taux de bactérie viable serait réduit à 10^3 /mL (Fechner et al., 2019).

Même si le colostrum et le lait contaminés ont été définis comme facteurs de risque, ils n'apparaissent pas comme majeurs dans la littérature. Un lien de causalité entre les sources d'alimentation lactée et la transmission de *Map* n'a d'ailleurs pas été identifié (Doré et al., 2012). Au moment de la parturition, la transmission de *Map* au jeune par le lait ou le colostrum serait de surcroît négligeable par rapport à sa transmission par l'environnement si ce dernier est contaminé (Eisenberg et al., 2015). La littérature se contredit concernant les systèmes d'élevages les plus touchés par la PTB (Beaver et al., 2016; Zwald et al., 2004)), les pratiques et la zootechnie des éleveurs semblent plus déterminants que le système en lieu même.

Le péri-partum apparaît comme la période durant laquelle la gestion du risque doit être optimale. Les éléments définis comme importants à contrôler incluent l'hygiène de la mamelle (au tarissement et en péri-partum), l'hygiène de l'aire de vêlage, une séparation de la mère la plus rapide possible (inférieure à 6h) et une stérilisation du lait donné aux veaux (Beaver et al., 2016).

Le recours à un box individuel pour le vêlage et sa désinfection entre deux vêlages est également à privilégier même si difficile à réaliser en pratique (Doré et al., 2012).

La lutte contre *Map* est donc une lutte qui s'inscrit dans un plan global de prévention. Même si aucun lien de causalité n'a été démontré, le contrôle de l'excrétion lactée de la bactérie doit être inclus.

11) Exposition du consommateur

La consommation de produit laitier est surtout localisée dans les pays dits riches tel que l'Europe et l'Amérique du Nord d'après la Figure 11. Les consommateurs principaux sont les nourrissons et les enfants.

Le développement de la filière est soutenu par la croissance de la population et de sa consommation (elle pourrait augmenter de 45 à 75kg par habitant). Une hausse de la consommation des habitants des pays émergents doit aussi être prise en compte (« Un marché qui croît à l'export », s. d.).

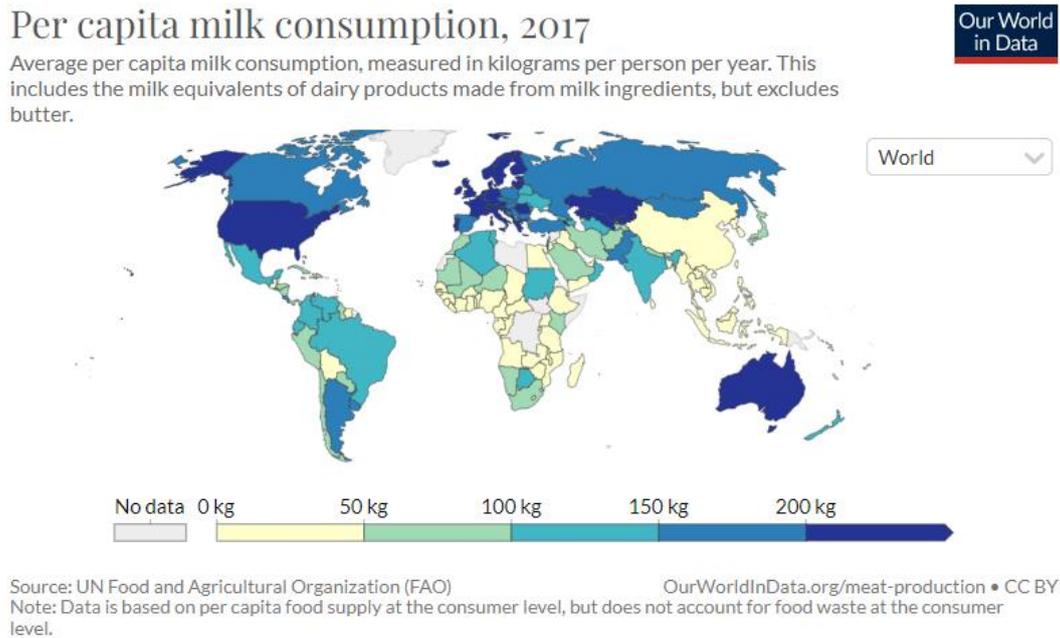


Figure 11: Carte de la consommation mondiale de produit laitier par habitant et par an (sauf beurre).

Aux Etats-Unis les maladies ayant pour origine les produits laitiers seraient inférieures à 1%. Ce chiffre pourrait être sous-estimé à défaut de preuve du caractère zoonotique de certains agents infectieux comme *Map* (Kuenstner et Kuenstner, 2021).

Le lait et ses produits dérivés représentent les principales sources d'exposition du consommateur à *Map*. Les méthodes de pasteurisation appliquées dans les différents pays ne permettent pas un assainissement complet de ces denrées. Même si *Map* est quantitativement moins importante dans les produits à base de lait pasteurisé, elle se retrouve aussi bien dans ces produits que dans ceux élaborés à partir de lait cru (fromages et des poudres de lait infantiles) (Kuenstner et Kuenstner, 2021). En effet, *Map* se retrouve dans tout type de fromages, que ce soit au lait cru, pasteurisé, ou ayant une stérilisation thermique douce. En l'absence de pasteurisation l'innocuité des fromages repose sur la salaison et l'inoculation de bactéries lactiques. Ces bactéries produisent des acides organiques abaissent le pH durant la maturation des fromages. L'efficacité de ces méthodes concernant la destruction de *Map* est discutable. Même si la viabilité de *Map* au sein des produits fromagers n'a pu être démontrée, on retrouve le bacille dans 12 à 50% des fromages selon les produits et études (Gill et al., 2011).

Il n'existe pas de preuve concernant une possible concentration du bacille de Johnne's dans les produits dérivés du lait. La charge bactérienne des produits serait surtout inhérente aux troupeaux fournissant le lait à transformer. (Gill et al., 2011).

Les études rapportent de faible taux d'exposition par produit laitier consommé (Kuenstner et Kuenstner, 2021; Ricchi et al., 2016). Ces observations restent à moduler en fonction de la quantité de produit consommé par an.

12) Détection de *Map* dans le lait

Il est possible de détecter la présence de *Map* dans le lait. La sérologie ELISA sur lait est actuellement le test qui est le plus réalisé. Elle est précédée de la mise en culture de l'échantillon. Cette méthode est considérée comme le gold standard pour la détection de *Map* dans le lait. Sa spécificité est élevée (83-100%) mais sa sensibilité médiocre entre 21 et 61% selon la littérature (Foddai, Watson, McAloon et Grant, 2021).

Contexte et objectifs de l'étude

Le Groupement de Défense Sanitaire (GDS) et le Groupement Technique Vétérinaire (GTV) de la Meuse réalisent en collaboration avec l'UMR INRAE-ENVIT 1225 IHAP un suivi longitudinal pour évaluer les conséquences de la vaccination contre la paratuberculose dans plusieurs troupeaux bovins laitiers infectés par *Map*. Les paramètres mesurés en réponse à la vaccination comprennent :

- La réponse sérologique des individus
- L'excrétion du bacille dans les fèces
- L'excrétion du bacille dans le lait
- Les conséquences sur les paramètres technico-économiques des élevages

Les premiers résultats de cette étude (Baldet et Duret, 2019; Corbiere et al., 2022) ont mis en évidence une réduction de la probabilité d'excrétion fécale de *Map* chez les bovins vaccinés avant l'âge de 4 mois, comparativement aux bovins non vaccinés, les niveaux d'excrétion n'étant cependant pas significativement différents. De plus, l'ensemble des éleveurs s'accordent à la fois sur une diminution des cas cliniques, une amélioration de la production et de la longévité de leurs animaux. Cependant, dans ces élevages, la vaccination s'inscrit dans un plan de lutte multimodal, incluant par ailleurs des mesures de maîtrise du risque d'exposition des jeunes animaux, et l'imputabilité de la seule vaccination dans ces résultats reste à déterminer.

Le travail présenté dans ce manuscrit avait pour principal objectif d'évaluer l'influence de la vaccination sur l'excrétion de *Map* dans le lait. Les objectifs secondaires étaient de déterminer si la probabilité d'excrétion mammaire dépendait par ailleurs de l'état de santé de la mamelle, et du statut sérologique et excréteur fécal.

I. MATERIEL ET METHODE

1. Population d'étude

1.1. Elevages

Le département de la Meuse (55) est situé dans la région Grand Est et compte environ 680 éleveurs de bovins laitiers. Au total on dénombre 47 397 vaches laitières produisant 3 659 495 hL de lait soit 16% de la production régionale. (Rapport Agreste Grand Est, Synthèse départementale, Juin 2017, <https://draaf.grand-est.agriculture.gouv.fr/>).

Le rapport d'activité 2021 du GDS Meuse référence 191 cheptels engagés dans un plan d'assainissement contre la paratuberculose. Parmi eux, 17 ont vaccinés leurs animaux entre fin 2014 et 2016 dont 8 étaient volontaires pour participer au suivi longitudinal mis en place par l'UMR IHAP. Les résultats des sérologies de prophylaxie annuelle vis-à-vis de *Map* de ces élevages sont présentés dans le Tableau 1 pour les campagnes précédant la mise en place de ce suivi (-2014-2017). Ces analyses sérologiques ont été effectuées sur les animaux non vaccinés. Hormis pour l'élevage B, les incidences sérologiques annuelles demeuraient élevées.

Dans la présente étude, seuls 6 élevages ont été retenus. L'élevage D a souhaité se retirer de l'étude. L'exclusion de l'élevage C a été faite pour des raisons technico-pratiques. En effet, la population contrôlée était constituée uniquement de bœufs du même âge, non vaccinés. La mesure d'une baisse de l'excrétion de *Map* dans le lait sur ces animaux n'était donc pas possible.

Tableau 1: Incidence sérologique annuelle vis à vis de la paratuberculose sur les campagnes de prophylaxie de 2014 à 2017 dans les 8 élevages participants à l'étude. Calcul à partir des résultats obtenus par prophylaxie sanitaire annuelle.

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

1.2 Programme de vaccination dans le cadre d'un plan de maîtrise (<https://gdsreseau3m.com/>)

Le plan de maîtrise ou de lutte s'effectue sur la base du volontariat. Ses objectifs sont :

- La disparition des cas cliniques au sein du cheptel
- La maîtrise de la maladie
- L'assainissement progressifs des cheptels touchés : éviter les rechutes cliniques et limiter l'excrétion et la circulation du bacille.

On ne parle donc pas ici d'une éradication totale du bacille dans les élevages.

Pour atteindre ces objectifs les deux piliers d'action sont :

- Le dépistage suivi de l'élimination des bovins positifs
- La maîtrise des facteurs de risque de contamination (mesures d'hygiène strictes, limitation des introductions d'animaux).

Le recours au vaccin se fait par demande écrite auprès de la DDSCPP. Elle doit être justifiée par des résultats défavorables en prophylaxie paratuberculose depuis plusieurs campagnes et la présence de

cas cliniques avérés au sein de l'élevage. La vaccination interférant avec les tests de dépistage de la tuberculose, un statut sanitaire favorable vis-à-vis de cette maladie est requis. Si la demande est acceptée l'éleveur bénéficie d'une dérogation à ce dépistage.

Le choix des animaux à vacciner se fait lors d'une visite conjointe du vétérinaire sanitaire et d'un agent du GDS. Elle est généralement réservée aux femelles âgées de 1 à 6 mois. Cependant, lors de la mise en place de la vaccination dans les élevages, des animaux âgés jusqu'à 1 an peuvent avoir été vaccinés.

Le protocole vaccinal consiste en une injection sous-cutanée d'une dose de vaccin Silirum®.

1.3 Effectif de prélèvement et échantillons sélectionnés

1.1.3.1 Prélèvements : effectif et modalités

Les vaches incluses dans le suivi longitudinal mis en place par l'UMT IHAP devaient être en début de 2^{ème} lactation (âge de 36 mois minimum) et non promises à la réforme au début de l'étude.

Le suivi longitudinal comprenait la collecte d'échantillons de fèces, de sang et de lait, tous les 6 mois environ, entre 2018 et 2020. Les échantillons de lait n'ont été recueillis qu'à trois occasions (avril et octobre 2018 ; avril 2019).

D'autres facteurs ont limité le prélèvement de lait chez les vaches incluses dans le suivi :

- Le statut physiologique : les vaches tarées ou ayant mis bas quelques jours avant notre passage ont été exclues.
- Accessibilité de la salle de traite : difficultés de visualisation des identifications, vaches non repérées et marquées au préalable par l'éleveur, etc.

Le protocole de prélèvement de lait consistait, après nettoyage des 4 trayons à l'alcool et élimination des premiers jets, à récupérer à minima 10 mL de lait dans un tube Falcon® 50. Les échantillons, une fois identifiés, étaient déposés en fin de journée au laboratoire vétérinaire départemental de la Meuse pour congélation et conservation à -20°C avant rapatriement sur le site de l'ENVT en fin de semaine.

1.1.4 : Echantillons étudiés

L'ensemble des échantillons de lait recueillis n'a pas été analysé. Une première sélection a été faite sur la base du statut excréteur fécal (qPCR sur fèces) concomitant des vaches, établi au préalable. Un second critère de sélection était basé sur les comptages de cellules somatiques du lait (CCS). Pour cela, les données des contrôles laitiers des mois pré, post et concomitant au prélèvement de lait ont été utilisées, afin de définir des vaches saines (CCS < 150 000 sur les 3 mois) et infectées mammaires chroniques (au mieux CCS > 250 000 sur les 3 mois, ou CCS > 250 000 le mois du prélèvement). Les données du contrôle laitier permettent également de connaître le stade de lactation (jours en lait) des différentes vaches prélevées. La répartition est présentée dans le Tableau 2.

Sur la base de ces critères de sélection, 142 échantillons de lait ont été retenus pour analyse. Leur répartition par élevage est présentée dans le Tableau 2 et selon le statut vaccinal, le statut excréteur fécal de *Map* et les CCS du lait dans le Tableau 2. Pour ces 3 tableaux, chaque échantillon correspond à un bovin.

Tableau 2: Nombre d'échantillon retenus par élevage et par campagne de prélèvement

	Avril 2018	Octobre 2018	Avril 2019	TOTAL
Elevage A	21	11	15	47
Elevage B	14	1	13	28
Elevage E	4	0	8	12
Elevage F	3	0	7	10
Elevage G	13	23	8	44
Elevage H	1	0	0	1
				142

Tableau 3: Répartition des échantillons par élevage selon le statut vaccinal, le statut excréteur fécal et le taux cellulaire du lait des vaches

BV	VACCINES				NON VACCINES			
	PCR +		PCR -		PCR +		PCR-	
	Haut	Faible	Haut	Faible	Haut	Faible	Haut	Faible
PCR Map sur fèces								
Taux cellulaires								
Elevage A	0	0	2	14	2	0	6	23
Elevage B	0	0	3	7	1	1	5	11
Elevage E	0	0	1	3	2	0	2	4
Elevage F	0	0	0	6	0	1	1	2
Elevage G	11	15	3	1	3	9	0	2
Elevage H	0	0	1	0	0	0	0	0

Tableau 4: Répartition des vaches prélevées par élevage selon leur stade de lactation et leur statut vaccinal.

	STADE DE LACTATION							
	<3 mois		[3-6[[6-9[≥9	
	Vaccinés	Non vaccinés	Vaccinés	Non vaccinés	Vaccinés	Non vaccinés	Vaccinés	Non vaccinés
ELEVAGE A	5	3	7	12	4	11	0	5
ELEVAGE B	6	1	3	9	1	7	0	1
ELEVAGE E	0	0	4	1	0	1	0	5
ELEVAGE F	0	0	3	1	3	2	0	1
ELEVAGE G	4	4	15	6	5	1	6	3
ELEVAGE H	0	0	1	0	0	0	0	0

2. Evaluation de l'excrétion de *Map* par qPCR

2.1 Evaluation de l'excrétion sur lait entier

Les échantillons ont été décongelés au préalable la veille de l'extraction puis conservés à l'étuve à 37°C durant toutes les étapes de l'extraction pour favoriser son homogénéisation et casser les globules de gras formés. L'extraction de l'ADN de *Map* à partir du lait bovin a été réalisée suivant le protocole du kit ADIAPURE™ PARATB MILK.

Il repose sur la capture des mycobactéries par des billes électromagnétiques suivie de la lyse de leur paroi pour libérer l'ADN.

Après plusieurs essais, l'extraction selon ce kit fut un échec. Nous avons contacté le fabricant, vérifié le pH du lait, chauffé le lait pour tenter de casser le plus possible les globules de gras et le caillé formé, laissé plus de temps de migration (jusqu'à plus de 30 minutes). Malgré tous ces recours, les billes migraient difficilement vers les parois des tubes utilisés, qu'ils soient en plastique ou en verre. Elles ne se fixaient pas à la paroi et, quelle que soit la technique utilisée pour éliminer le lait restant (renversement ou pipetage délicat) une grande quantité des billes étaient perdues (Figure 12).

Compte-tenu de ces difficultés, nous suspectons déjà au cours de la réalisation du protocole la non interprétabilité des résultats. C'est pourquoi, sur les échantillons dont les volumes ne permettaient pas la réalisation des deux manipulations (<20mL), il a été choisi de privilégier le deuxième protocole décrit ci-dessous (I.2.2). Les résultats obtenus selon ce nouveau protocole ont confirmé l'échec de la capture des *Map* présentes dans le lait entier par l'utilisation du kit ADIAPURE™ PARATB MILK.

Figure 12: Photos de la capture magnétique de Map par billes électromagnétiques



2.2 Evaluation de l'excrétion sur culot cellulaire

1.2.2.1 Extraction des acides nucléiques

Après une nuit de décongélation, 10mL de lait entier de chaque échantillon ont été prélevés puis centrifugés à 2500 G pendant 15 min (température de centrifugation entre 17-22°C). Après élimination manuelle de la graisse et séparation du surnageant, le culot a été re-suspendu dans 10 mL de PBS, puis congelé à -80°C.

Après une nouvelle décongélation les échantillons ont à nouveau été centrifugés à 1000 G pendant 5 minutes et le PBS éliminé par retournement. Puis 200 µg de culot cellulaire ont été prélevés et remis en suspension avec 400 µL de tampon T1 du kit d'extraction NucleoMag 96 Tissue® (Nacherey Nagel, France) dans des microtubes de lyse contenant 300 mg de billes de verre (Kit VK01, billes de verre 0.1 mm, Bertin Technologies, France). Après broyage (3*30 secondes à 6800 rpm avec 30 secondes de pause entre chaque cycle, Precellys 24®, Bertin Technologies, France) et centrifugation (5 min à 14 000 G), 100 µL de surnageant sont récupérés et mis en plaque, puis congelés à -80°C.

L'extraction de l'ADN a ensuite été réalisée par billes magnétiques selon le protocole du kit NucleoMag 96 Tissue®, à l'aide d'un robot Kingfisher Flex® (Thermo Fisher Scientific, France), avec addition d'un contrôle d'extraction (kit Adiavet paraTB Real Time, BioX, Belgique).

A chaque plaque d'échantillons testés, ont été ajoutés des échantillons de contrôle, composés d'échantillons de fèces d'un bovin et d'un ovin connus pour excréter fortement *Map*. Par ailleurs des échantillons de culot cellulaire de lait d'une vache en phase clinique terminale de paratuberculose, conservés à -20°C et à -80°C ont été aussi inclus, après application du même protocole que pour les échantillons à tester. L'objectif était de déterminer un possible impact de la température de congélation des échantillons de lait à tester sur la conservation des acides nucléiques.

1.2.2.2 Amplification de la séquence IS900

L'amplification en temps réel (qPCR) a été réalisée selon le protocole du kit Adiavet paraTB Real Time (BioX Belgique) sur un thermocycleur LightCycler 96, avec 45 cycles d'amplification.

Chaque cycle est composé des phases suivantes :

- 1) Dénaturation : séparation des brins d'ADN induit par élévation de la température à 94°C
- 2) Hybridation : la température est abaissée entre 40 et 65°C permettant aux demis brins d'ADN et aux amorces de s'hybrider du fait de la complémentarité de leur séquence.

- 3) Elongation : la température s'élève de nouveau, à 72°C cette fois, pour permettre à la Taq polymérase de synthétiser les brins d'ADN complémentaires. Elle ajoute des désoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces hybridées.

Chaque cycle permet de doubler la séquence initiale. Au total quarante-cinq cycles sont réalisés ce qui permet de produire 2^{45} copies de la séquence IS900.

Le système TaqMan repose sur l'utilisation d'une sonde ADN, la sonde TaqMan qui est composé de 20 à 40 paires de bases. Elle est spécifique à l'un des deux brins de la séquence ADN IS900 et se fixe à cette dernière lors de la phase d'hybridation.

1.2.2.3 Quantification de l'ADN :

Aux extrémités de la sonde TaqMan, on retrouve des fluorophores R et Q (Reporter et Quencher). Le fluorophore R ne produit pas de fluorescence lorsqu'il se retrouve comme ici à proximité du fluorophore Q. Lors de la phase d'élongation, la séquence TaqMan fixé est dégradé provoquant ainsi la libération du fluorophore R et donc sa fluorescence. Ainsi, grâce au logiciel de gestion du thermocycleur on peut suivre l'amplification de la séquence cible IS900 en temps réel par augmentation de la fluorescence. Cette mesure se découpe en 3 phases :

- La ligne de base ou bruit de fond, lors de laquelle la quantité de fragment produit ne suffit pas à produire suffisamment de fluorescence pour qu'elle soit détectée. C'est la partie de la courbe n'est pas interprétée.
- La phase exponentielle, le signal fluorescent est suffisamment important pour être détecté. Le point Ct (« cycle seuil ») est ainsi défini, c'est le point de la courbe pour lequel la quantité de fluorescence est suffisante pour être détectée de manière significative par rapport à la ligne de seuil. Cette dernière est placée au point d'inflexion de la ligne de base.
- La phase plateau ou de saturation est la phase d'épuisement de la réaction par manque de réactif disponible. L'amplification s'arrête.

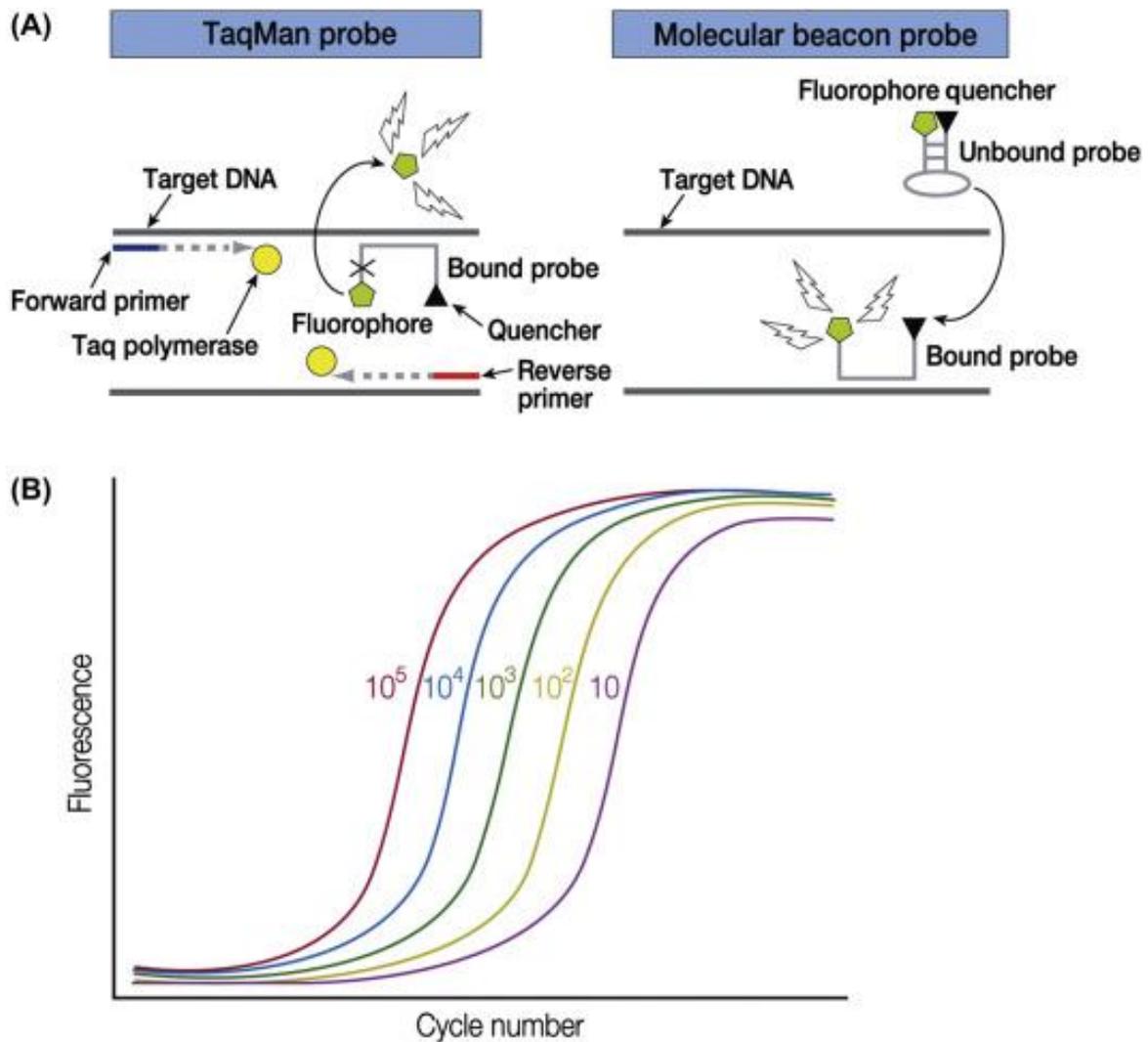


Figure 13: Schéma du principe de la PCR en temps réel, Wang-Shick Ryu, Wang-Shick Ryu, Chapter 4 - Diagnosis and Methods, Editor(s): Wang-Shick Ryu, Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses, Academic Press, 2017, Pages 47-62, ISBN 9780128008386

On obtient à la fois un résultat qualitatif, en comparant la valeur Ct de l'échantillon à celle du témoin positif et quantitative par comparaison à la gamme de dilution définie au préalable. On a un rapport inversement logarithmique entre le nombre de cycles nécessaire pour qu'un échantillon soit positif, et la quantité d'ADN présent dans l'échantillon. Autrement dit, plus le Ct d'un échantillon est faible, plus il contient de l'ADN de *Map*.

La gamme de dilution a été réalisée à partir d'ADN génomique de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (souche de référence K10 ATCC 19698, UMR INRA 311 ISP Nouzilly). Une gamme en 16 points a été réalisée (Tableau 5).

Tableau 5: moyenne des Ct et coefficients de variation obtenus pour les principaux points de la gamme de dilution d'ADN purifié de la souche K10

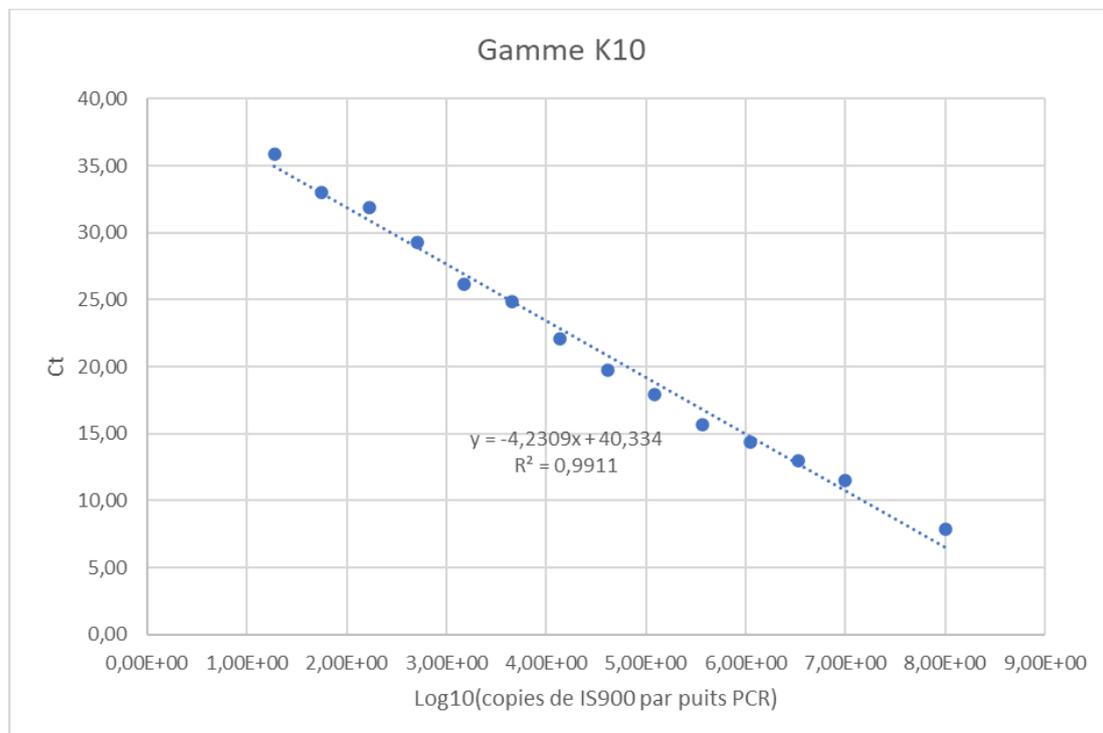
N° du point de la gamme	Copies IS900 par puit	Moyenne Ct	Coefficient de variation (%)
1	10^8	7,89	13,85
2	10^7	11,48	0,78
3	$3,33 \times 10^6$	13,01	1,46
4	$1,11 \times 10^6$	14,40	1,47
5	$3,70 \times 10^5$	15,66	1,21

6	1,23x10 ⁵	17,92	1,67
7	4,12x10 ⁴	19,71	1,87
8	1,37x10 ⁴	22,09	2,34
9	4,57x10 ³	24,89	2,53
10	1,52x10 ³	26,20	1,26
11	5,08x10 ²	29,32	0,57
12	1,69x10 ²	31,89	0,10
13	56,5	33,02	1,14
14	18,8	35,82	2,59
15	6,27	34,31	2,16
16	2,09	Non détecté	-

Une régression linéaire est ensuite appliquée pour laquelle à tout Ct moyen d'un point de la gamme on associe le logarithme du nombre de copies IS900 avant amplification (N₀) (Figure 13). On obtient une bonne corrélation de ces deux paramètres ($r^2=0.9911$) et l'équation suivante :

$$Ct = -4.2309 \times \log(\text{IS900}) + 40.334$$

Figure 14: Régression linéaire $Ct=f(\text{Log}(\text{IS900}))$ réalisée à partir de la gamme de dilution d'ADN purifié de la souche K10



A partir de cette gamme, la plus petite quantité de gène IS900 détectable est d'une seule copie. Cette unique copie correspond à un Ct de 40,334.

Pour atteindre un équivalent génome de Map il faut 18 copies d'IS900 par puits PCR. Par conséquent, on s'attend à un Ct de sortie minimal d'environ 35 pour une seule bactérie par puit PCR ($-4,23 * \log_{10}(18) + 40,334 = 35,02$), valeur proche de la moyenne obtenue pour 3 reliquats ($35,82 \pm 0,93$).

Pour estimer la charge bactérienne dans l'échantillon initial de 10mL, on tiendra compte d'un facteur de dilution égal à 75, lié à la préparation de l'échantillon de lait testé : sur les 10 mL de lait contenant en moyenne 2,5 g de culot (valeurs variant de 1,5 g à 3,5 g), 200 µg sont prélevés auxquels sont ajoutés 400 µl de tampon T1 ($0,2 / 2,5 = 0,08 = 1/12,5$). Après broyage 100 µl de surnageant sont utilisés pour l'extraction (soit 1/6 du mélange culot + T1).

$$\text{Equivalent Map/ 10 mL de lait} = \frac{10^{(a \times Ct + b)}}{18} \times 7,5$$

$$\text{Avec } a = \frac{-1}{4.2309} \text{ et } b = \frac{40.334}{4.231}$$

3. Analyse des données

Une analyse descriptive des résultats a tout d'abord été réalisée. L'influence des différents facteurs explicatifs potentiel de l'excrétion de Map dans le lait a tout d'abord été réalisée par des comparaisons univariées de fréquence à l'aide du test exact de Fisher. Les variables explicatives explorées étaient :

- Le statut vaccinal vis-à-vis de la paratuberculose, et l'âge à la vaccination ;
- Le statut mammaire : sain / infecté chronique ;
- Le statut excréteur fécal, positif ou négatif,
- Le stade de lactation,

Des modèles logistiques multivariées ont aussi été ajustés aux données afin d'évaluer l'effet de la variable vaccination en tenant compte de celui des autres facteurs de variation potentiels explorés. La variable réponse était le résultat (positif ou négatif) de la qPCR sur le lait. Les variables explicatives étaient le statut vaccinal (selon les modèles : vacciné ou non vacciné ; vacciné avant ou après l'âge de 4 mois ou non vacciné), le statut cellulaire du lait (faible ou élevé), le statut excréteur fécal (positif ou négatif), le statut sérologique (positif ou négatif) et le stade de lactation, défini en 4 groupes : [0-3 mois [, [3-6 mois [, [6-9 mois [et ≥ 9 mois.

L'ensemble des analyses et descriptions graphiques a été réalisé à l'aide du logiciel R. Un risque alpha de 5% a été retenu pour définir le seuil de significativité.

II. RESULTATS

1. qPCR sur lait entier

Sur les 142 échantillons de lait entier correspondant aux 142 bovins prélevés :

- 22 n'ont pas du tout pu être analysés par échec du protocole (>15%)
- L'extraction par les billes a été satisfaisante pour 39 bovins soit 27.5% (migration des billes à la paroi et récupération de la majeure partie)
- Les échantillons restants ont nécessité un temps de migration supérieur à 20 minutes pour qu'elle soit jugée satisfaisante.

Sur les 120 échantillons analysés en qPCR, 4 ont donné un résultat non négatif (Tableau 6).

Tableau 6: Résultats de qPCR sur lait entier

BV	VACCINES				NON VACCINES			
Effectifs	60				60			
PCR fèces	Positive		Négative		Positive		Négative	
<i>Taux cellulaire</i>	Haut	Faible	Haut	Faible	Haut	Faible	Haut	Faible
Nombre de BV positifs	0	0	1	0	0	0	0	3
N° échantillon	823				114-151-132			

Parmi ces échantillons, seuls 2 étaient également positifs en PCR sur culot cellulaire (Tableau 7).

Tableau 7: Equivalent bactériens associés aux valeurs de Ct

Valeur CT	≤30]30-35]]35-39]	>39
Charge bactérienne estimée (équivalent bactéries / 10 mL de lait)	>1000	[100-1000[[10-100[<10
Nombre d'échantillons	0	1	2	1

2. qPCR sur culot cellulaire : ensemble des échantillons testés

1.1 Echantillons positifs

Sur les 142 échantillons testés, 37 (26.0%) ont donné un résultat positif en qPCR à partir du culot cellulaire. La répartition des Ct est présentée par le Tableau 8. La valeur moyenne des Ct était de 36,24 pour une valeur médiane de 35,58. La répartition des données est asymétrique avec des effectifs plus importants pour les Ct tardifs. Ces Ct correspondent à des échantillons de faible charge bactérienne.

Les Ct obtenus sur le culot cellulaire du lait du bovin témoin en phase clinique terminale (20- 515), étaient de 39.18 pour l'échantillon conservé à -20°C et de 34.74 pour celui conservé à -80°C.

A partir de chaque valeur de cycle on définit un équivalent bactérien correspondant et donc la charge bactérienne ramené à un millilitre de lait.

Tableau 8: Charge bactérienne des échantillons positifs.

Valeur CT	<30]30-35[]35-39]	≥39
Charge bactérienne estimée (équivalent bactéries / 10 mL de lait)	>1000	[100-1000[[10-100[<10
Nombre d'échantillons	0	14	13	10

1.2 Bovins positifs

Sur 142 bovins testés, 37 sont positifs en qPCR sur le lait. On considère un bovin positif si au moins un de ces échantillons montrent un résultat positif en qPCR lait. Sur les 30 bovins dont l'échantillon a été analysé deux fois, 4 sont considérés positifs.

Ces quatre bovins positifs ne le sont que pour l'un des deux échantillons analysés. Les valeurs de Ct obtenus pour ces bovins donnent les équivalents bactériens suivant :

- <10 bactéries par 10mL pour 3 échantillons
- Entre 10 et 100 bactéries par 10 mL pour 1 échantillon

Tableau 9: Répartition des bovins positifs par élevage

	Nombre de bovins testés	Nombre de bovins positifs
Elevage A	47	7
Elevage B	28	8
Elevage E	12	3
Elevage F	10	4
Elevage G	44	15
Elevage H	1	0

Il n'existe pas d'impact significatif du facteur élevage sur la probabilité pour un bovin d'avoir un résultat positif en PCR lait pour la recherche de *Map*.

Tableau 10: Résultats globaux

BV	VACCINES				NON VACCINES			
Total : 142	67				75			
Résultats PCR sur fèces	Positif		Négatif		Positif		Négatif	
Effectifs	26		41		19		56	
Taux cellulaire	Haut	Faible	Haut	Faible	Haut	Faible	Haut	Faible
Effectifs	11	15	10	31	8	11	10	46
Nombre de BV positifs	4	5	3	5	0	4	2	14

1.2 Analyse univariable de l'influence des différents facteurs sur l'excrétion de *Map* dans le lait

1.2.a) Statut vaccinal

Les résultats PCR à l'échelle des échantillons et à l'échelle des bovins sont respectivement présentés dans le Tableau 11 et le Tableau 12. Les proportions d'échantillons ($p=1$) ou de bovins positifs ($p=0.57$) ne différaient pas de manière statistiquement significative selon le statut vaccinal ($p=1$).

Tableau 11: Effectifs des échantillons positifs selon leur statut vaccinal

	Vaccinés	Non vaccinés
Nombre d'échantillons testés	80	95
PCR Lait Positive	17	20
%positifs	21.3	21.1

Tableau 12: Effectifs des bovins positifs selon leur statut vaccinal.

	Vaccinés	Non vaccinés
Nombre de vaches	67	75
PCR lait Positive	17	20
%positifs	25.4	26.7

1.2.b) Statut excréteur fécal

La répartition des échantillons et des vaches selon les résultats des qPCR sur les culots cellulaires et le statut excréteur d=fécal sont présentés dans les Tableaux 13 et 14.

Aucune différence significative liée au statut excréteur fécal n'a pu être mise en évidence, que ce soit à l'échelle des échantillons de lait ($p=0.67$) qu'à celle des vaches ($p=0.82$).

Tableau 13: Effectifs des échantillons positifs en PCR lait selon le statut excréteur fécal des vaches

PCR fèves	Positive	Négative
Echantillons de lait	43	132
PCR lait Positive	10	27
%positifs	23.2	20.4

Tableau 14: Effectifs des bovins positifs en PCR lait selon leur statut excréteur fécal

PCR fèces	Positive	Négative
Bovins	35	107
PCR lait Positive	10	27
%positifs	28.6	25.2

L'effet du statut excréteur fécal, analysé séparément chez les vaches vaccinées et non vaccinées n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre ces deux groupes (Tableau 15 et 16).

Tableau 15: Statut PCR lait vis à vis de Map selon le statut excréteur fécal chez les bovins vaccinés

BOVINS VACCINES		
PCR fèces	Positive	Négative
Bovins	20	47
PCR lait Positive	6	11
%positifs	30.0	23.4

Tableau 16: Statut PCR lait vis à vis de Map selon le statut excréteur fécal chez les bovins non vaccinés.

BOVINS NON VACCINES		
PCR fèces	Positive	Négative
Bovins	15	60
Positifs	4	16
%positifs	26.7	26.7

1.2.c) Taux cellulaire du lait

Au sein de la population globale, (traduite par un taux cellulaire élevé) n'était pas significativement associé à une augmentation de la proportion de résultat positifs en PCR sur le lait, ni à une augmentation de la charge bactérienne détectée.

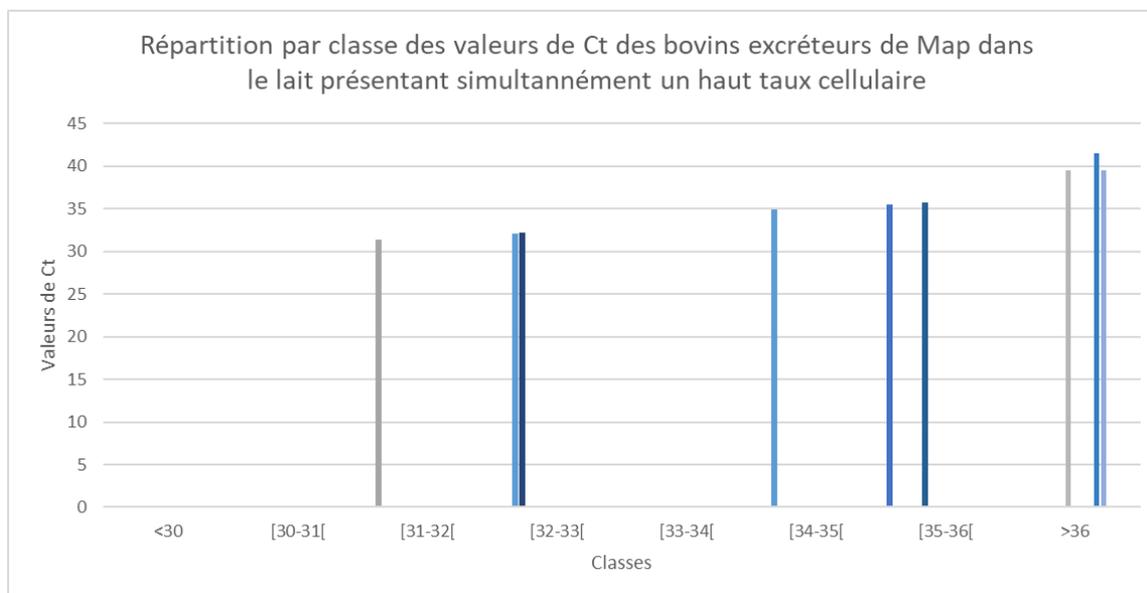
Tableau 17: Effectifs des échantillons positifs en PCR lait selon leur taux cellulaire laitier

Taux cellulaire	Haut	Faible
Echantillons	49	126
Positifs	9	28
%positifs	18.37	22.22

Tableau 18: Effectifs des bovins positifs en PCR lait selon leur taux cellulaire laitier

Taux cellulaire	Haut	Faible
Bovins	39	103
Positifs	9	28
%positif	23.08	27.18

Figure 15: Répartition des cycles de sorties qPCR des bovins avec une altération de l'intégrité de leur mamelle



L'analyse séparée selon le statut vaccinal conduit aux mêmes conclusions ($p=0.36$ pour les bovins vaccinés et $p = 0.12$ pour les bovins non vaccinées).

Tableau 19: Statut PCR lait vis à vis de Map selon le taux cellulaire du lait chez les vaches vaccinées.

BOVINS VACCINES		
Taux cellulaire	Haut	Faible
Echantillons	24	56
Bovins	21	46
PCR lait Positive	7	10
% bovins positifs	33.3	21.7

Tableau 20: Statut PCR vis à vis de Map selon le taux cellulaire du lait chez les vaches non vaccinées.

BOVINS NON VACCINES		
Taux cellulaire	Haut	Faible
Echantillons	25	70
Bovins	18	57
PCR lait Positive	2	18
% bovins positifs	31.6	11.1

1.2.d) Stade de lactation

D'après les tableaux et figures présentés ci-dessous, il n'existe pas un stade de lactation où l'excrétion de *Map* est plus importante ou pour lequel la charge bactérienne excrétée est plus élevée, et ce quel que soit la population d'étude (globale, vaccinée ou non vaccinée).

Tableau 21: Répartition des échantillons et bovins positifs selon le stade de lactation

MEL	[0-3[[3-6[[6-9[>9
Echantillons	29	74	36	36
Bovins	23	64	26	29
PCR lait positive	4	19	6	8
% bovins positifs	17.4	29.7	23.1	27.6

Tableau 22: Répartition des Bovins vaccinés selon le mois en lait depuis le dernier vêlage (MEL)

BOVINS VACCINES				
MEL	[0-3[[3-6[[6-9[>9
Echantillons	19	38	17	6
Bovins	15	34	13	6
PCR lait positive	3	8	4	2
% bovins positifs	20.0	23.5	30.8	33.3

Figure 16: Cycle de sortie PCR des bovins vaccinés positifs à Map dans le lait en fonction de leur stade de lactation.

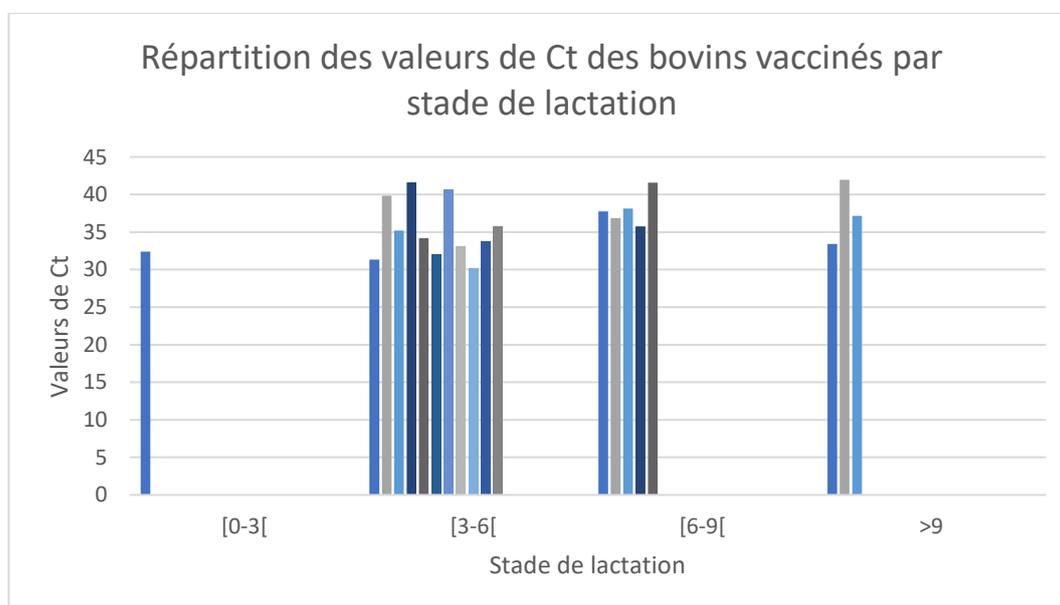
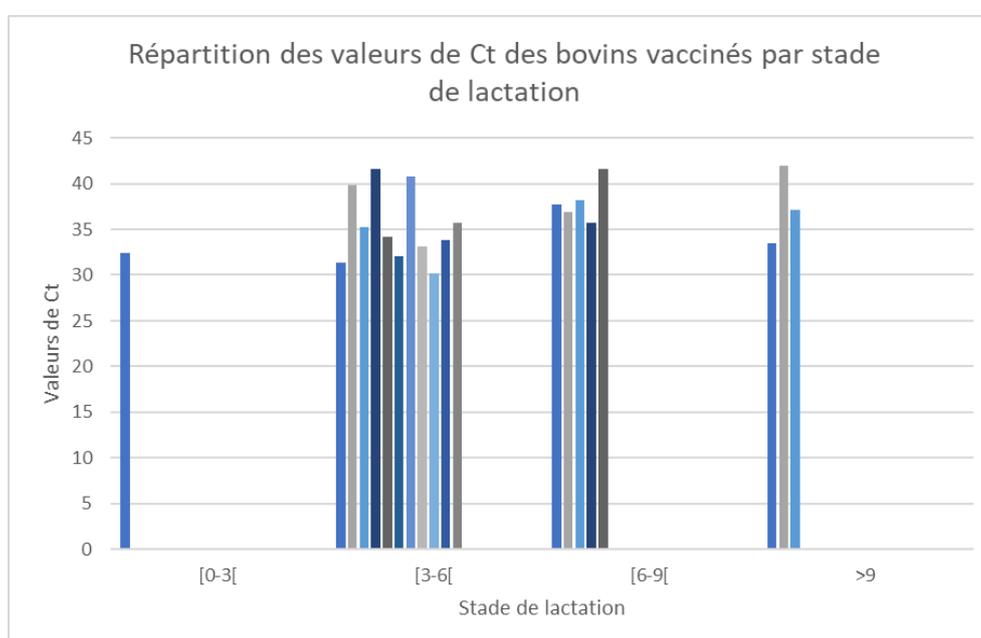


Tableau 23: Répartition des Bovins non vaccinés selon le mois en lait depuis le dernier vêlage (MEL)

BOVINS NON VACCINES				
<i>MEL</i>	[0-3[[3-6[[6-9[>9
Echantillons	10	36	19	30
Bovins	8	30	13	23
PCR lait positive	1	11	2	6
% bovins positifs	12.5	36.7	15.4	26.1

Figure 17: Cycle de sortie PCR des bovins non vaccinés positifs à Map dans le lait en fonction de leur stade de lactation.



1.2.e) Influence de l'âge à la vaccination

Pour ce paramètre deux bovins ont été retiré de l'analyse car pour ces vaches la vaccination a été réalisée tardivement suite à des résultats sérologiques positifs. Cette décision a été prise sur volonté de l'éleveur et en essai curatif à défaut de préventif.

Ainsi le tableau suivant est réalisé sur un effectif total de 78 échantillons et 65 bovins.

Tableau 24: Répartition des échantillons et bovins positifs en PCR lait selon l'âge auquel ils ont été vaccinés

<i>Age de vaccination en mois</i>	[0-4[[4-8[>8
Echantillons	13	36	29
Bovins	10	32	23
PCR lait positive	1	9	6
% bovins positifs	10.0	28.1	26.1

La proportion de résultats positifs chez les vaches vaccinées avant l'âge de 4 mois (10%) était plus faible que chez celles vaccinées entre 4 et 8 mois (28.1%) et au-delà de 8 mois (26.1%), mais cette différence n'était pas significative ($p=0.63$).

1.2.f) Statut sérologique

La vaccination induit une séropositivité chez certains animaux vaccinés. On ne peut donc pas réaliser une analyse globale sur la population d'étude totale.

Pour ce facteur, les deux bovins vaccinés tardivement suite à leur séropositivité sont ici aussi exclus.

Tableau 25: Influence du statut sérologique sur l'excrétion de Map dans le lait chez les bovins vaccinés

BOVINS VACCINES		
Statut sérologique	Positive	Négative
Echantillons	29	49
Bovins	27	38
PCR lait positive	8	7
% bovins positifs	29.6	18.4

Tableau 26: Influence du statut sérologique sur l'excrétion de Map dans le lait chez les bovins non vaccinés

BOVINS NON VACCINES		
Statut sérologique	Positive	Négative
Echantillons	2	93
Bovins	2	73
PCR lait positive	1	19
% bovins positifs	50.0	17.8

Le statut PCR sur le lait n'était pas significativement lié au statut sérologique de la vache vis-à-vis de la paratuberculose, ni chez les vaches vaccinées ($p = 0.37$). Les effectifs de vaches non vaccinées séropositives étaient trop faibles pour réaliser une comparaison avec les vaches non vaccinées séronégatives.

3. Analyse de l'effet des différents facteurs de risque potentiel : analyse multivariées.

Des modèles logistiques multivariées ont été ajustés aux données afin d'évaluer l'effet de la variable vaccination en tenant compte de celui des autres facteurs de variation potentiels explorés. La variable réponse était le résultat (positif ou négatif) de la qPCR sur le lait. Les variables explicatives étaient le statut vaccinal (selon les modèles : vacciné ou non vacciné ; vacciné avant ou après l'âge de 4 mois ou non vacciné), le statut cellulaire du lait (faible ou élevé), le statut excréteur fécal (positif ou négatif), le statut sérologique (positif ou négatif) et le stade de lactation, défini en 4 groupes : [0-3 mois [, [3-6 mois [, [6-9 mois [et ≥ 9 mois.

Aucune des variables explicatives incluses n'avait de relation statistiquement significative avec la probabilité d'excrétion de Map dans le lait, confirmant les analyses univariées présentées précédemment.

III. DISCUSSION

1. Schéma d'étude

A notre connaissance, il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude sur l'effet du vaccin Silirium[®] ni plus largement de la vaccination sur l'excrétion de *Map* dans le lait. Si on extrapole les résultats sur l'excrétion fécale obtenus par la méta-analyse de Bastida et Juste, 2011, une diminution de 36 à 99% de la charge bactérienne est souhaitable. Dans les troupeaux bovins laitiers qui ont servi de support à notre étude, une diminution de l'excrétion fécale de *Map* de l'ordre de 50% a été mise en évidence chez les vaches vaccinées au Silirium[®] avant l'âge de 4 mois (Baldet et Duret 2019, Corbiere et al, 2022). Lors de leur étude, Baldet et Duret disposaient d'une puissance statistique de 98% (risque alpha de 5% et bêta de 10%) à partir du prélèvement de 249 bovins vaccinés et 237 bovins non vaccinés contre respectivement 67 et 75 notre étude.

Sous l'hypothèse d'une prévalence d'excrétion d'environ 25% chez les bovins non vaccinés et d'une réduction de moitié chez les animaux vaccinés, des effectifs plus importants que ceux inclus dans notre étude (150 échantillons par groupe) auraient été nécessaires pour assurer une puissance statistique satisfaisante de 80%. Toujours sous l'hypothèse d'une prévalence d'excrétion de 25% dans le groupe non vacciné, la réduction minimale détectable permise par les effectifs disponibles (67 et 75 bovins dans les groupes vaccinés et non vaccinés), était de 66 % (prévalence d'excrétion de 8.5% dans le groupe vacciné).

Ces calculs de puissance et de différence minimale détectable ne tiennent par ailleurs pas compte des autres facteurs de variation potentiels de l'excrétion de *Map* dans le lait, tels que le taux cellulaire du lait, l'âge à la vaccination, le statut excréteur fécal, le statut sérologique ou le stade de lactation.

Ainsi, la puissance statistique permise par les effectifs inclus dans notre étude était relativement faible, et ne permettait que la mise en évidence d'une réduction très importante de la prévalence d'excrétion de *Map* dans le lait.

2. Limites liées au choix de la population d'étude

L'échantillon d'étude est d'abord subdivisé en deux groupes (vaccinés et non vaccinés). Afin d'étudier l'influence de deux principaux facteurs sur l'excrétion de *Map* dans le lait (statut excréteur fécal, taux cellulaire du lait) la population a été subdivisée au total en 8 sous-groupes d'intérêt. Pour avoir un effectif suffisant dans chacune de ces classes et du fait d'un nombre réduit d'échantillons collectés, l'échantillonnage n'est pas réalisé de façon aléatoire.

Cette sélection permet de s'affranchir des biais liés à l'âge des individus (les bovins prélevés étaient tous en deuxième lactation) :

- Biais d'exposition : du fait de conditions différentes de naissance ou d'élevage entre les individus vaccinés et non vaccinés.
- Biais de pression infectieuse : Les élevages étant adhérent à un plan d'assainissement on espère une diminution de cette pression au fil des années.

Par ailleurs, le plan de lutte mis en place depuis plusieurs années au sein de ces élevages inclu également des mesures de biosécurité, et de dépistage et élimination des animaux séropositifs, qu'ils soient en phase clinique ou non. Or il n'est pas possible de mesurer l'impact de ces mesures sur l'assainissement des troupeaux, et donc la part réellement attribuable à la seule vaccination. Néanmoins, l'incidence sérologique annuelle n'a pas montré d'évolution significative dans les campagnes précédant l'étude, suggérant un impact malheureusement limité de ces mesures de prévention.

De plus, certains groupes sont sous représentés. Selon nos hypothèses, les bovins les plus à risque d'excréter *Map* dans le lait étaient les animaux non vaccinés, excréteurs fécaux, avec des taux cellulaires du lait élevés. Cependant, seulement 8 individus correspondaient à ces critères et aucun

d'entre eux n'a été identifié comme excréteur de *Map* dans le lait. La difficulté de réunir suffisamment d'individus avec ces critères s'explique par le fait qu'en réalité, au sein des différents élevages, ces bovins fortement à risque ne sont pas conservés, car ils font l'objet d'une réforme anticipée sur la base de la dégradation de la santé mammaire (infection mammaire chronique). Ainsi le critère taux cellulaire est biaisé. Les individus intégrant cette classe ont ainsi des taux cellulaires supérieurs aux autres mais qui restent acceptables pour être conservés en production.

Le comptage cellulaire du lait analysé a été considéré comme élevé sur la base de 3 comptages cellulaires successifs entourant l'échantillon analysé ayant des valeurs supérieures à 250 000. Compte tenu du faible nombre d'échantillons répondant à ce critère, la sélection a été étendue aux vaches ayant un comptage cellulaire élevé le mois du prélèvement (Tableau 27). Cette extension a été justifiée par le fait que le prélèvement de lait a eu lieu, dans ces cas, relativement près du contrôle laitier (tableau 28). Il aurait été évidemment préférable d'avoir le taux cellulaire réel du lait analysé. Malheureusement, il nous a été impossible, pour des raisons logistiques, de mettre en œuvre ces comptages. On peut cependant supposer qu'un délai de 1 jour entre la réalisation de la prise d'échantillon et le contrôle laitier ne biaisent pas les résultats. Cependant, il n'est pas exclu que pour certaines vaches, ces comptages ne soient pas en réalité, élevés (ou inversement bas) le jour de la prise d'échantillon.

Tableau 27: Taux cellulaires des vaches définies comme ayant un haut taux cellulaire dans le lait.

N°	Vacciné	Statut vis-à-vis de la PTB	CCS_mois n-1	CCS_mois n	CCS mois n+1	Moyenne
461	Non	Négatif	166	270		218
823	Oui	Négatif	107	269	90	155
050	Non	Négatif	49	374	110	178
504	Non	Négatif		323	24	174
041	Non	Négatif	23	331	29	128
051	Non	Négatif	23	387	37	149
129	Non	Négatif	105	340	239	228
716	Non	Négatif	14	599	39	217
853	Non	Positif	27	294	114	145
307	Non	Positif	11	479	27	172
861	Oui	Positif	50	285	44	126
253	Oui	Positif	67	375	73	172
350	Oui	Négatif	24	483	34	180
308	Oui	Négatif	30	319	49	133

Tableau 28: Date des prélèvements par rapport aux différents contrôles laitiers.

	CAMPAGNE DU 24-26/04/2018		CAMPAGNE DU 14-21/10/18		CAMPAGNE DU 15-19/04/19	
	Contrôle laitier	Date du prélèvement pour l'étude	Contrôle laitier	Date du prélèvement pour l'étude	Contrôle laitier	Date du prélèvement pour l'étude
Élevage A	23/04/18	25/04/18	18/10/18	17/10/18	16/04/19	17/04/19
Élevage B	23/04/18	25/04/18	22/10/18	24/10/18	19/04/19	23/04/19
Élevage E	17/04/18	25/04/18	26/09/18	17/10/18	02/04/19	17/04/19
			05/11/18		02/05/19	
Élevage F	05/04/18	25/04/18	28/09/18	17/10/18	18/04/19	17/04/19
	10/05/18		01/11/18			
Élevage G	25/04/18	26/04/18	26/10/18	18/10/18	29/03/19	18/04/19
					28/04/19	
Élevage H	16/04/18	24/04/18	24/09/18	16/10/18	25/03/19	16/04/19
			05/11/18		29/04/19	

Enfin, notre étude souffre énormément de l'influence du facteur élevage. Comme le montre le Tableau 2, il y a une forte disparité des individus sélectionnés dans chaque élevage. Ils ne sont pas également représentés dans l'étude. Cette disparité s'explique par la volonté d'avoir une homogénéité entre les effectifs des différentes classes. Ainsi par exemple avec le critère taux cellulaire, un élevage avec une incidence élevée de mammite sera sur-représenté. S'ajoutent à ce facteur les biais de pression d'infection, de conditions d'élevage et des mesures d'assainissement inhérentes à chaque élevage.

Si l'effectif au sein d'un des cheptels l'avait permis, il aurait fallu réaliser cette étude sur un seul élevage pour s'affranchir de ces différents facteurs. Ou à défaut sur 2 à 3 élevages mais avec d'avantage de campagnes de prélèvements totaux et des répétitions par bovins.

3. Protocole de détection de *Map* dans le lait

Au vu des résultats obtenus lors des deux expérimentations, le faible nombre d'échantillons positifs sur le lait entier peut avoir plusieurs origines. La première étant le faible volume de lait analysé. Dans les études récentes de Foddai et al (2020,2021), les concentrations rapportées étaient de 6.7 à 42.1 bactéries pour 50 millilitres de lait. Dans notre travail, seuls 10 millilitres ont été analysés. Proportionnellement, la charge bactérienne décelable est réduite à 1 à 8 bactéries pour 10 mL ce qui concorde avec les résultats obtenus. De plus, le lait est une matrice complexe naturellement riche en cellules, protéines solubles, matières grasses, enzymes, ADN non bactérien, ou agents inhibiteurs de la réaction PCR.

Lors de la décongélation des échantillons, il fut difficile de casser le caillé et les globules gras formés pour obtenir un échantillon homogène. Les complexes ainsi formés ont potentiellement emprisonné *Map*. La réalisation d'une capture des *Map* par billes magnétiques selon le protocole ADIAPURE™ PARATB MILK™ n'a pas été satisfaisante. De nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de sa mise en pratique (voir 2.1 Evaluation de l'excrétion sur lait entier). Le protocole de capture de ce kit commercial semble inadapté aux échantillons de lait congelés. De plus, sa faible sensibilité de détection (entre 6 et 60 bactéries par mL de lait) par rapport à d'autres méthodes (phase-assay notamment) constitue une limite additionnelle pour la mise en évidence de *Map* dans nos différents échantillons de lait entier.

Afin d'augmenter la sensibilité de détection de l'analyse sur culot cellulaire, il aurait été pertinent d'utiliser comme substrat le culot cellulaire d'échantillon de 50 millilitres de lait. Cependant, les volumes de lait collectés étaient généralement inférieurs, compris entre 20 et 35 mL, ne permettant pas de mettre en œuvre cette recommandation.

La culture a longtemps été la méthode de référence pour détecter la présence de *Map* vivantes dans le lait. Cependant, elle présente des difficultés de mise en œuvre notamment du fait de son caractère chronophage et de sensibilité analytique assez faible (de l'ordre de 100 bactéries par millilitre). Ainsi, de nouvelles méthodes diagnostiques ont été récemment développées, basées sur l'utilisation de bactériophages (Swift et al 2013, 2020 ; Foddai et al 2009). Ce développement a été permis par l'adaptation à *Map* d'un dispositif commercial initialement destiné à la détection de *Mycobacterium tuberculosis* dans les expectorations chez l'homme (FASTPlaqueTB™ assay, Biotec Laboratories Ltd., Ipswich, UK) (Stanley et al 2007). Parmi elle, la méthode de séparation phagomagnétique (PhMS) se montre prometteuse. Elle se base sur un virus mycobactériophage, le virus D29, capable de capturer, concentrer et lyser les cellules viables de *Map*. De plus, pour capturer et séparer magnétiquement *Map* de la matrice cellulaire ce virus est lié à des particules (peptides) (MyOne Tosylactivated Dynabeads, BcMag™) par liaisons covalentes. Le virus D29 n'étant pas spécifique de *Map*, sa présence doit ensuite être confirmée par PCR. La PCR permet également de quantifier la charge bactérienne présente dans l'échantillon. Le protocole de détection qPCR de l'IS900 par méthode TaqMan se différencie des autres par sa clarté concernant la conversion de la quantité d'ADN en charge bactérienne. Il possède également une sensibilité supérieure (Foddai et Grant, 2020).

Au total, l'ensemble du protocole PhMS-qPCR peut être réalisé en 7h, pour une sensibilité de 1 *Map* vivante pour 50mL de lait (Foddai et Grant, 2020; Foddai et al., 2021). Il s'agit d'une amélioration de la méthode développée par la même équipe, mais qui nécessitait 48 heures pour obtenir un résultat (Foddai et al., 2011, 2017). Une étude a également comparé ses performances à celle de la méthode ELISA de référence pour la détection de vaches infectées. Les spécificités obtenues lors de l'essai se sont révélées similaires pour les deux protocoles (96,26% pour la PhMS-qPCR et 95,09% pour la méthode culture-ELISA). En revanche, la PhMS-qPCR a montré une sensibilité 2.5 fois supérieure à la détection d'anticorps dans le lait par ELISA (70,96% contre 26,65%). Même si supérieure, il faut garder en tête qu'elle demeure relativement faible pour un test diagnostique (Foddai et al., 2021). Ces performances ont été confirmées par Beinhauerova et Slana, 2021.

Les moyens de conservation du lait pourraient éventuellement poser problème avec l'utilisation de ce protocole. Dans le cadre de notre schéma d'étude, on admet des pertes en termes de vitalité des mycobactéries du fait de la congélation. La différence des résultats Ct obtenus pour un même bovin témoin en stade clinique terminal, indique que la conservation à -20°C, pour des échantillons avec une faible charge bactérienne, est susceptible de conduire à une dégradation de l'ADN. Les autres possibilités sont une imprécision de manipulation ou un échantillon non homogène. Les méthodes basées sur l'utilisation de bactériophages permettent la détection et quantification de *Map* vivantes et non uniquement de fragment d'ADN pouvant être issues de *Map* mortes. Malheureusement les protocoles d'analyse par utilisation de bactériophages ne sont réalisables que sur lait frais, non congelé, et n'ont pas pu être mis en œuvre dans notre étude.

Néanmoins, d'après Beinhauerova et Slana, 2021, le protocole PhMS-qPCR permettrait d'identifier un individu excréteur même si une seule bactérie vivante est présente dans l'échantillon testé. En revanche la charge bactérienne sera sans nul doute sous-estimée.

Enfin, toujours d'après Beinhauerova et Slana, 2021, même si le protocole permet de s'affranchir de la matrice cellulaire laitière, une élimination des globules de gras inhibiteur de l'action des bactériophages présente un intérêt.

4. Résultats

4.1. Prévalence de l'excrétion de *Map* dans le lait

La proportion de bovins positifs dans le lait qPCR parmi l'ensemble des bovins testés était de 21.14% (contre 20% en fèces et une séropositivité de 17.14%). Il n'existe pas à ce jour d'enquête estimant la prévalence de *Map* dans les troupeaux laitiers français. Toutefois, elle se situe dans les valeurs basses de l'intervalle rapporté au Royaume-Uni soit entre 20 et 35% (Foddai et al., 2021). Notons cependant que notre échantillon d'étude n'était pas représentatif de l'ensemble des vaches des troupeaux inclus dans l'étude, compte tenu des critères de sélection cherchant à augmenter la proportion de vaches à risque d'être excrétrice dans le lait (vaches excrétrices fécales, comptages cellulaires élevés...).

Aucun effet statistiquement significatif de la vaccination n'a pu être mis en évidence par notre étude. Les prévalences au sein des populations vaccinées et non vaccinées étant respectivement de 21.25% et 21.05%. L'interprétation de ces résultats doit cependant se faire avec prudence au vu des faibles effectifs dont nous disposons et de nombreux autres facteurs de risques potentiels.

De même, aucune corrélation positive ou négative, entre les résultats des échantillons de lait, fèces ou sanguin n'a pu être montrée.

On note également une faible répétabilité des résultats pouvant être imputée à une sensibilité non optimale du protocole. En effet sur les 31 analyses réalisées en duplicata, 5 bovins ont donné un résultat positif en qPCR à au moins une occasion, mais aucun ne s'est révélé positif sur les deux analyses effectuées. Parmi eux, 4 présentaient une charge bactérienne inférieure à 10 bactéries pour 10 millilitres, la charge bactérienne du 5^{ème} était dans l'intervalle de 10 à 100 bactéries pour 10 millilitres.

4.2. Statut excréteur laitier

A titre indicatif, selon les élevages, la proportion de bovins positifs en qPCR sur culot cellulaire variait de 0 à 40%. Au vu des modalités de sélection, non aléatoires, des échantillons de lait testés, ces observations ne peuvent cependant pas refléter la part de bovin excréteur de *Map* dans le lait dans chaque troupeau.

Parmi les bovins identifiés comme excréteur, 62,16% avaient une concentration de *Map* à la limite du seuil de détection (Charge bactérienne <10 *Map*/ 10 millilitres de lait). Une part non négligeable de résultats faussement négatifs ne peut donc être exclues.

Un seul bovin a montré un taux d'excrétion de 100 à 1000 bactéries par millilitre (soit 2.70% des positifs). Cet individu n'était pas vacciné, séronégatif, non identifié comme excréteur fécal de *Map* et le taux cellulaire de son lait était qualifié de faible. A lui seul, cet individu illustre les difficultés de diagnostic de la PTB par les outils actuels. Une autre possibilité expliquant cette observation est la possible contamination du lait par des matières fécales lors de la traite. Ainsi, il serait intéressant pour l'optimisation des plans de dépistage actuels et futurs, d'avoir recours d'une part à une prophylaxie multimodale à la fois sérologique, fécale et laitière. Les prélèvements réalisés dans le cadre du contrôle laitiers pour les éleveurs adhérents pourraient ainsi servir de support régulier pour permettre un dépistage précoce et identifier les individus fortement excréteurs. Par ailleurs, contrairement aux fèces il n'y a pas d'excrétion passive de *Map* dans le lait, ce qui pourrait réduire le risque de faux positif ou confirmer un résultat douteux en PCR fèces (Baldet, Duret, 2019).

Notre n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de la vaccination sur l'excrétion de *Map* dans le lait, contrairement à ce qui put être montré pour l'excrétion fécale dans les élevages ayant servi de support à notre étude. Au-delà des effectifs trop réduits d'échantillons analysés pour assurer une puissance statistique suffisante, d'autres facteurs peuvent masquer ou réduire l'effet de la vaccination : âge de vaccination, statut infectieux réel des bovins et stade d'évolution, pratiques d'élevage ayant une influence sur la pression d'infection, mesures entreprises dans le cadre du plan de maîtrise.

La méta-analyse de Bastida et Juste, 2011, ne rapporte pas d'autre essai portant sur une réduction de l'excrétion de *Map* dans le lait grâce à la vaccination. Cependant, une diminution de l'excrétion fécale est rapportée en majorité, de même qu'une diminution des lésions intestinales observées. La nécessité d'études comparatives avec des effectifs plus importants est indiquée pour confirmer ou infirmer nos résultats. La réalisation de répétition sur les échantillons déjà analysés avec un protocole optimisé est également souhaitable.

Nos résultats n'ont pas pu démontrer une influence de l'âge de vaccination sur la probabilité d'excrétion de *Map* dans le lait, ni sur la charge bactérienne excrétée.

Aucun stade de lactation ne semble plus propice à l'excrétion de *Map*. La charge bactérienne excrétée ne semble pas non plus en dépendre. Le caractère transitoire de son excrétion fécale est établi. Il serait intéressant d'apprécier l'excrétion laitière de *Map* durant toute une lactation chez des bovins reconnus comme excréteur. De cette manière nous pourrions déterminer si l'excrétion est permanente avec une tendance à suivre une cinétique ou si au contraire elle est intermittente et aléatoire. Il faudrait pour cela s'affranchir de tout stress environnemental extérieur ou inhérent à l'individu (maladies intercurrentes).

4.3. Influence du taux cellulaire

Le taux cellulaire est utilisé en tant que reflet de l'état de santé de la mamelle. Les vaches ayant des mammites chroniques et donc des taux cellulaires élevés de manière prolongée pourraient être plus à risque d'excréter une bactérie intracellulaire telle que *Map*, et ce en grande quantité. Les résultats obtenus n'ont pas confirmé nos hypothèses, ni en termes de probabilité d'excrétion, ni en termes de charge bactérienne détectée.

Ces résultats sont à considérer avec de nombreuses réserves inhérentes aux différentes limites concernant l'effectif de notre schéma d'étude. En effet, l'étude de Lombard, 2011 a montré une

augmentation de la sensibilité aux mammites chez les bovins séropositifs à *Map*. Bien que non définie la relation entre ces deux affections existe donc bel et bien.

De plus, nous ne disposons que d'une minorité de bovin avec un taux cellulaire qualifié de haut selon nos critères d'inclusion (39/142).

IV. CONCLUSION

Bien que mal comprise, l'excrétion du bacille de Johne dans le lait n'est plus à démontrer. De nos jours, l'exposition chronique du consommateur à cet agent potentiellement zoonotique poussent les agents de la filière laitière et les organisations gouvernementales de santé à développer des programmes de surveillance et de contrôle de la qualité du lait. Par ailleurs le lait contaminé par des *Map* est une source d'exposition et de contamination des veaux. Même si les charges bactériennes excrétées dans le lait sont sans commune mesure avec celles pouvant être mises en évidence dans les fèces des vaches infectées, l'exposition répétée, sur le long terme (plusieurs semaines, voire mois en élevage bovin allaitant) justifie les travaux cherchant à évaluer et réduire la fréquence et l'intensité de cette excrétion.

En France, ces mesures ne sont pas encore entrées en vigueur. Néanmoins, devant le caractère endémique de *Mycobacterium avium ssp paratuberculosis* sur notre territoire, il convient d'instaurer dès à présent des mesures de surveillance et d'assainissement de nos cheptels. Malgré l'absence de programme à l'échelle nationale, les groupements de défense sanitaire développent de plus en plus des plans de lutte territoriaux basés sur le dépistage et l'élimination précoce des animaux infectés. Malheureusement, ces mesures demandent un investissement lourd à la fois économique, technique et humain pour une efficacité et une rentabilité peu satisfaisante. L'autorisation de la vaccination apparaît ici comme une nouvelle perspective d'amélioration et d'accélération des programmes en vigueur.

L'étude menée avait pour objectif principal l'évaluation d'un éventuel impact de la vaccination Silirium® sur l'excrétion laitière du bacille de Johne. Dans un second temps, nous avons également cherché à évaluer l'influence des infections mammaires chroniques sur la probabilité d'excrétion de *Map* dans le lait. Le schéma d'étude et les résultats obtenus ne permettent pas d'identifier d'effet bénéfique de la vaccination sur l'excrétion de *Map* dans le lait.

Ces observations restent à consolider car l'étude souffre d'une faible puissance statistique. L'inclusion d'un plus grand nombre d'échantillons est d'ores et déjà prévue. L'application de techniques de détection plus sensibles (PhMS-qPCR) pourrait conduire à des conclusions différentes, mais ne pourront malheureusement pas être mise en œuvre à partir de nos échantillons congelés.

Si l'effet de la vaccination n'a pu être estimé, le potentiel du lait comme substrat pour la surveillance épidémiologique de la paratuberculose est à considérer. En effet, les méthodes de dépistage annuel par sérologie de la paratuberculose manquent de sensibilité et de précocité par rapport à un dépistage PCR sur fèces. Par ailleurs, la vaccination conduisant à une séroconversion chez une proportion non négligeable de bovin, la sérologie n'est plus applicable pour la détection des nouvelles infections dans les troupeaux vaccinés. Par ailleurs, la réalisation d'un dépistage qPCR mensuel sur fèces présente trop de contraintes techniques et économiques pour être mis en place. En revanche, le prélèvement régulier d'échantillons de lait de traite ne nécessite pas d'intervenant particulier et peut d'autant plus être facilité par l'adhésion au contrôle laitier. Par ailleurs, il pourrait donner une estimation de la prévalence de la paratuberculose dans les cheptels laitiers français et identifier des leviers pour la lutte contre cette maladie.

Bibliographie

- Abb-Schwedler, K., Maeschli, A., Boss, R., Graber, H. U., Steiner, A. et Klocke, P. (2014). Feeding mastitis milk to organic dairy calves: effect on health and performance during suckling and on udder health at first calving, 11.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments (dir.). (2009). *Paratuberculose des ruminants*. Maisons-Alfort : AFSSA.
- Arsenault, R. J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P. et Napper, S. (2014). From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Veterinary Research*, 45(1), 54.
- Aust, V., Knappstein, K., Kunz, H.-J., Kaspar, H., Wallmann, J. et Kaske, M. (2013). Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(6), 1091-1103.
- Baldet, Duret. (s. d.). Vaccination contre la paratuberculose bovine : situation épidémiologique dans 8 élevages bovins laitiers de la Meuse., 79.
- Bastida, F. et Juste, R. A. (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, 9(1), 8.
- Beaver, A., Ruegg, P. L., Gröhn, Y. T. et Schukken, Y. H. (2016). Comparative risk assessment for new cow-level Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infections between 3 dairy production types: Organic, conventional, and conventional-grazing systems. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9885-9899.
- Beinhauerova, M. et Slana, I. (2021). Application of the Actiphage® Assay to Detect Viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Cells in Fresh Sheep and Goat Milk and Previously Frozen Milk and In-Line Milk Filters. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 752834.
- Botsaris, G., Swift, B. M., Slana, I., Liapi, M., Christodoulou, M., Hatzitofi, M., Christodoulou, V., & Rees, C. E. (2016). Detection of viable Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *International journal of food microbiology*, 216, 91–94.
- Brugel, C. (s. d.). Interprétation des réponses sérologiques non-négatives vis-à-vis de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) dans des situations de faible prévalence de l'infection, 130.
- Camanes, G., Joly, A., Fourichon, C., Ben Romdhane, R. et Ezanno, P. (2018). Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach. *Veterinary Research*, 49(1), 60.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P. et Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(3), 328-345.
- Collins, M. T., Gardner, I. A., Garry, F. B., Roussel, A. J. et Wells, S. J. (2006). Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(12), 1912-1919.
- Corbett, C. S., de Jong, M. C. M., Orsel, K., De Buck, J. et Barkema, H. W. (2019). Quantifying transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis among group-housed dairy calves. *Veterinary Research*, 50(1), 60.
- Fabien Corbiere, Dorra Guellouz, Estelle Gonzalez, Julie Cournet, Christian Tasca, Emma Dubaux, Laurent Foures, Gilles Foucras "Effects of Silirum® based vaccination programs on Map faecal shedding and serological response in seven French dairy

- herds.” International Colloquium on Paratuberculosis (ICP), 12-16 juin 2022, Dublin
- Foddai, A., Elliott, C. T., & Grant, I. R. (2009). Optimization of a phage amplification assay to permit accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis cells. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 3896–3902.
- Foddai, A.C.G., et I.R. Grant. « Sensitive and Specific Detection of Viable *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis in Raw Milk by the Peptide-Mediated Magnetic Separation-Phage Assay ». *Journal of Applied Microbiology* 122, n° 5 (mai 2017): 1357-67.
- Foddai, Antonio, Samuel Strain, Robert H. Whitlock, Christopher T. Elliott, et Irene R. Grant. « Application of a Peptide-Mediated Magnetic Separation-Phage Assay for Detection of Viable *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis to Bovine Bulk Tank Milk and Feces Samples ». *Journal of Clinical Microbiology* 49, n° 5 (mai 2011): 2017-19.
- Foddai, Antonio C. G., et Irene R. Grant. « A Novel One-Day Phage-Based Test for Rapid Detection and Enumeration of Viable *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis in Cows’ Milk ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, n° 21 (novembre 2020): 9399-9412.
- Direction régionale de l’Alimentation, de l’Agriculture et de la P. région G. E. (2022, 12 avril). Meuse (55). Repéré à <https://draaf.grand-est.agriculture.gouv.fr/Meuse-55,184>
- Doré, E., Paré, J., Côté, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Roy, J. P. et Fecteau, G. (2012). Risk Factors Associated with Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to Calves within Dairy Herd: A Systematic Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(1), 32-45.
- Dufour, B., Pouillot, R. et Durand, B. (2004). A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Veterinary Research*, 35(1), 69-81.
- Eisenberg, S., Nielen, M., Hoeboer, J., Bouman, M., Heederik, D., & Koets, A. (2011). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in bioaerosols after depopulation and cleaning of two cattle barns. *The Veterinary record*, 168(22), 587.
- Eisenberg, S. W., Rutten, V. P. et Koets, A. P. (2015). Dam *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) infection status does not predetermine calves for future shedding when raised in a contaminated environment: a cohort study. *Veterinary Research*, 46(1), 70.
- Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R. et Jayarao, B. M. (2009). Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2634-2643.
- Fanelli. (2020). Paratuberculosis at European scale: an overview from 2010 to 2017. *Veterinaria Italiana*, 56(1), 13-21.
- Fechner, K., Dreyman, N., Schimkowiak, S., Czerny, C.-P. et Teitzel, J. (2019). Efficacy of dairy on-farm high-temperature, short-time pasteurization of milk on the viability of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11280-11290.
- Foddai, A. C. G. et Grant, I. R. (2020). A novel one-day phage-based test for rapid detection and enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cows’ milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(21), 9399-9412.
- Foddai, A. C. G., Watson, G., McAloon, C. G. et Grant, I. R. (2021). Phagomagnetic separation-quantitative PCR: A rapid, sensitive and specific surveillance tool for viable *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in bulk tank and individual cow milk samples. *Journal of Dairy Science*, 104(5), 5218-5228.
- Gerrard, Z. E., Swift, B., Botsaris, G., Davidson, R. S., Hutchings, M. R., Huxley, J. N., & Rees, C. (2018). Survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk. *Food microbiology*, 74, 57–63.

- Gill, C. O., Saucier, L. et Meadus, W. J. (2011). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Dairy Products, Meat, and Drinking Water†. *Journal of Food Protection*, 74(3), 480-499.
- González, J., Geijo, M. V., García-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J. M., Reyes, L. E., ... Pérez, V. (2005). Histopathological Classification of Lesions associated with Natural Paratuberculosis Infection in Cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 133(2-3), 184-196.
- Goodger, W. J., Collins, M. T., Nordlund, K. V., Eisele, C., Pelletier, J., Thomas, C. B. et Sockett, D. C. (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of Mycobacterium paratuberculosis infections in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(11), 1877-1881.
- Guilhermet, R., Mathieu, C.-M., Toullec, R., Beaufile, M., Mansion, M. et Manis, Y. (1975). Transit des aliments liquides au niveau de la gouttière œsophagienne chez le veau préruminant et ruminant. *Annales de zootechnie*, 24(1), 69-79. Repéré à <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00887398>
- Harris, N. B. et Barletta, R. G. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 489-512.
- Kostoulas, P., Browne, W. J., Nielsen, S. S. et Leontides, L. (2013). Bayesian mixture models for partially verified data: Age- and stage-specific discriminatory power of an antibody ELISA for paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 111(3-4), 200-205.
- Kralik, P., Babak, V. et Dzedzinska, R. (2014). Repeated cycles of chemical and physical disinfection and their influence on Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis viability measured by propidium monoazide F57 quantitative real time PCR. *The Veterinary Journal*, 201(3), 359-364.
- Kuenstner, L. et Kuenstner, J. T. (2021). Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in the Food Supply: A Public Health Issue. *Frontiers in Public Health*, 9, 647448.
- Les bases de l'alimentation du veau. (s. d.). *Réussir lait*. Repéré à <https://www.reussir.fr/lait/les-bases-de-l'alimentation-du-veau>
- LES MICI EN FRANCE – Observatoire National des MICI. (s. d.). Repéré à <http://www.observatoire-crohn-rch.fr/les-mici-en-france/>
- Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., ... Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(35), 12344-12349.
- Lombard, J. E. (2011). Epidemiology and Economics of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(3), 525-535.
- Mahillon, J. et Chandler, M. (1998). Insertion Sequences. *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.*, 62, 50.
- McAloon, Conor G., Paul Whyte, Simon J. More, Martin J. Green, Luke O'Grady, AnaBelen Garcia, et Michael L. Doherty. « The Effect of Paratuberculosis on Milk Yield—A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Dairy Science* 99, n° 2 (février 2016): 1449-60.
- McNees, A. L., Markesich, D., Zayyani, N. R. et Graham, D. Y. (2015). Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 9(12), 1523-1534.
- Mercier, P. et de Niort, L. (s. d.-a). Paratuberculose : éléments d'épidémiologie et description du plan de lutte français, 6.
- Meuse, C. d'agriculture de la. (2022, 11 mars). Bovins Lait. Repéré à <https://meuse.chambre-agriculture.fr/productions-agricoles/elevage/bovins-lait/>
- Minozzi, G., Williams, J. L., Stella, A., Strozzi, F., Luini, M., Settles, M. L., ... Neiberghs, H.

- L. (2012). Meta-Analysis of Two Genome-Wide Association Studies of Bovine Paratuberculosis. *PLoS ONE*, 7(3), e32578.
- Moravkova, M., Babak, V., Kralova, A., Pavlik, I. et Slana, I. (2012). Culture- and Quantitative IS 900 Real-Time PCR-Based Analysis of the Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a Controlled Dairy Cow Farm Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6608-6614.
- Nielsen, Søren Saxmose et Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(1), 1-14. doi:10.1016/j.prevetmed.2008.07.003
- Nielsen, S.S., Bjerre, H. et Toft, N. (2008a). Colostrum and Milk as Risk Factors for Infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4610-4615.
- Nielsen, S.S., Bjerre, H. et Toft, N. (2008b). Colostrum and Milk as Risk Factors for Infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4610-4615.
- Nos Chiffres clés – GDS Réseau 3M'. (s. d.). Repéré à https://gdsreseau3m.com/?page_id=125
- Occitanie, D. (2021, 9 mars). 01 - La nouvelle catégorisation des maladies animales et ses impacts. Repéré à <https://draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr/01-La-nouvelle-categorisation-des>
- Ozsvari, L., Harnos, A., Lang, Z., Monostori, A., Strain, S. et Fodor, I. (2020). The Impact of Paratuberculosis on Milk Production, Fertility, and Culling in Large Commercial Hungarian Dairy Herds. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 565324.
- Payeur, J. B. (2014). *Mycobacterium*. Dans *Encyclopedia of Food Microbiology* (p. 841-853). Elsevier.
- Raizman, E.A., J.P. Fetrow, et S.J. Wells. « Loss of Income from Cows Shedding *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis Prior to Calving Compared with Cows Not Shedding the Organism on Two Minnesota Dairy Farms ». *Journal of Dairy Science* 92, n° 10 (octobre 2009): 4929-36.
- Rasmussen, P., Barkema, H. W., Mason, S., Beaulieu, E., & Hall, D. C. (2021). Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 104(3), 3123–3143.
- Rathnaiah, G., Zinniel, D. K., Bannantine, J. P., Stabel, J. R., Gröhn, Y. T., Collins, M. T. et Barletta, R. G. (2017). Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 187.
- Ricchi, M., Savi, R., Bolzoni, L., Pongolini, S., Grant, I. R., De Cicco, C., ... Arrigoni, N. (2016). Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis load in raw bulk tank milk in Emilia-Romagna Region (Italy) by qPCR. *MicrobiologyOpen*, 5(4), 551-559.
- Rossi, G., Y.T. Grohn, Y.H. Schukken, et R.L. Smith. « The Effect of *Mycobacterium Avium* Ssp. Paratuberculosis Infection on Clinical Mastitis Occurrence in Dairy Cows ». *Journal of Dairy Science* 100, n° 9 (septembre 2017): 7446-54.
- Rowe, M. T. et Grant, I. R. (2006). *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology*, 7.
- Sanchez, M. P., Guatteo, R., Davergne, A., Saout, J., Grohs, C., Deloche, M. C., Tausat, S., Fritz, S., Boussaha, M., Blanquefort, P., Delafosse, A., Joly, A., Schibler, L., Fourichon, C., & Boichard, D. (2020). Identification of the ABCC4, IER3, and CBFA2T2 candidate genes for resistance to paratuberculosis from sequence-based GWAS in Holstein and Normande dairy cattle. *Genetics, selection, evolution : GSE*,

- 52(1), 14.
- Swift, Benjamin M. C., Nathan Meade, Elsa Sandoval Barron, Malcolm Bennett, Tania Perehenic, Valerie Hughes, Karen Stevenson, et Catherine E. D. Rees. « The Development and Use of Actiphage® to Detect Viable Mycobacteria from Bovine Tuberculosis and Johne's Disease-infected Animals ». *Microbial Biotechnology* 13, n° 3 (mai 2020): 738-46.
- Sevilla, I., Garrido, J. M., Geijo, M. et Juste, R. A. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiology*, 7(1), 18.
- Shankar, H., Singh, S. V., Singh, P. K., Singh, A. V., Sohal, J. S. et Greenstein, R. J. (2010). Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(2), e121-e126.
- Singh, S. V., Singh, A. V., Kumar, A., Singh, P. K., Deb, R., Verma, A. K., ... Dhama, K. (2013). Survival mechanisms of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within host species and in the environment—A review. *Natural Science*, 05(06), 710-723.
- Stabel, J. R. (1998). Johne's Disease: A Hidden Threat. *Journal of Dairy Science*, 81(1), 283-288.
- Stabel, J. R. (2008). Pasteurization of Colostrum Reduces the Incidence of Paratuberculosis in Neonatal Dairy Calves. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3600-3606.
- Swift, Benjamin M.C., Emily J. Denton, Sophie A. Mahendran, Jonathan N. Huxley, et Catherine E.D. Rees. « Development of a Rapid Phage-Based Method for the Detection of Viable *Mycobacterium Avium* Subsp. *Paratuberculosis* in Blood within 48 h ». *Journal of Microbiological Methods* 94, n° 3 (septembre 2013): 175-79.
- Stanley, E. C., Mole, R. J., Smith, R. J., Glenn, S. M., Barer, M. R., McGowan, M., & Rees, C. E. (2007). Development of a new, combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable *Mycobacterium paratuberculosis* bacteria within 48 hours. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1851–1857.
- Sweeney, R. W., Uzonna, J., Whitlock, R. H., Habecker, P. L., Chilton, P. et Scott, P. (2006). Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science*, 80(3), 253-259.
- Sweeney, R W, Whitlock, R. H. et Rosenberger, A. E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 166-171.
- Sweeney, Raymond W. (2011). Pathogenesis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(3), 537-546.
- Sweeney, Raymond W. (s. d.). Transm.ission of Paratuberculosis, (27), 3.
- Sweeney, R.W., Collins, M. T., Koets, A. P., McGuirk, S. M. et Roussel, A. J. (2012). Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1239-1250.
- Un marché qui croît à l'export. (s. d.). Repéré à <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/filiere-laitiere/un-marche-qui-croit-lexport>
- Whittington, R. J., Begg, D. J., de Silva, K., Purdie, A. C., Dhand, N. K. et Plain, K. M. (2017). Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). *BMC Veterinary Research*, 13(1), 328.
- Whittington, Richard J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B. et Reddacliff, L. A. (2004). Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in

theEnvironment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2989-3004.

Zwald, A. G., Ruegg, P. L., Kaneene, J. B., Warnick, L. D., Wells, S. J., Fossler, C. et Halbert, L. W. (2004). Management Practices and Reported Antimicrobial Usage on Conventional and Organic Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 87(1), 191-201.

ANNEXES

ANNEXE 1 : PROTOCOLE QPCR ADIAGENE ADAPTE

 école nationale vétérinaire toulouse U.M.R Interactions Hôtes – Agents Pathogènes (UMR 1225)	Mode opératoire	N° d'identification : PARATUBFECES-001
		Version :001
		Nombre de pages :
Détection de la paratuberculose par qPCR dans les fèces et culot cellulaire du lait		
Date d'émission : 29.03.2019	Dernière mise à jour : 08.02.2022	Date de retrait :
Rédigé par : Julie COURNET	Revu par : Fabien Corbiere	Approuvé par :
Diffusion : UMR 1225 IHAP		

Mots clés : paratuberculose, extraction ADN, qPCR

SOMMAIRE

1. Objet
2. Domaine d'application
3. Réactifs
4. Protocole
5. Nettoyage et élimination des déchets

1 – Objet

Détection de la paratuberculose dans des fèces, par qPCR.

2 – Domaine d'application

Diagnostic vétérinaire, biologie moléculaire.

3 – Réactifs

- EPI
- Vortex
- Balance
- Centrifugeuse
- Pipettes 1000 et 200
- Broyeur

Partie 1 : Préparation des échantillons

- Eau distillée (75 mL par échantillons)
- Abaisse-langue (1/échantillon)
- Flacon 125 mL (1/échantillon)
- Tubes de filtration ADIAFILTER (1/échantillon)
- Microtubes avec 300mg de billes (1/échantillon)
- DeepWell + film (2/échantillon)

Partie 2 : extraction et amplification par PCR

- DNAway
- 5 plaques **DeepWell de 2 mL** (5 pour 1 plaque d'extraction)
- Tampon de capture TDC
- Billes magnétiques
- Tampon de lavage MB3
- Tampon de lavage MB4
- Protéinase K + Protéine Buffer (PB)
- EPC-E (contrôle d'extraction du kit qPCR)
- Tampon T1
- Ethanol 80°
- Tampon de lavage MB6
- Kit qPCR BioXDiagnostic

Kit NucleoMag Macherey

4 – Protocole

La **veille sortir les échantillons du congélateur** (jusqu'à 180 échantillons sur une journée) + préparer les noms sur les flacons et tubes

1. Préparer une boîte de microtubes contenant 300mg de billes de verre (déjà prêt : bouchons bleu)
2. Prélever 2mg de culot (spatule en bois à utilisation unique) et transférer dans les microtubes
3. Ajouter 400 µL de tampon T1 (kit extraction MachereyNagel NucleoMag Tissue) dans chaque microtube

Broyage et mise en plaque

1. Préparer une boîte de polystyrène remplie de glace, 2 plaques Deepwell, 2 films aluminium, 2 portoirs à microtubes, et aller au bâtiment 10.1 en salle « verte »
2. Paramètre du broyeur, toujours rempli avec un échantillon sur deux
 - a. 3*30secondes à 6800 rpm avec 30 secondes de pause entre chaque
3. A la fin du broyage poser les microtubes dans de la glace, charger le broyeur pour le second run
4. Centrifuger les tubes 5min à 14000g
5. Prélever **100 µL de surnageant en passant sous l'anneau de graisse** et les disposer dans le puit correspondant sur une plaque Deepwell « Robot » + le reste dans une plaque « Stock » →
Préparation de 2 plaques

Partie 2 : Extraction et amplification par qPCR

Décongeler la plaque quelques heures avant la manip. **La mettre à -20°C la veille au soir.**

Centrifugation 2 minutes à 400 rpm (afin d'éviter la condensation). Nettoyer la paillasse avec du DNAway

Préparation des différents réactifs

- **Plaque 1** : tampon de capture **TDC**
 - o Mélanger **60 mL de tampon MB2** avec **1.3mL de billes** magnétiques dans un contenant.
 - o Dans une Deepwell, distribuer **600 µL(2x300 µL) du mélange par puit** échantillons
 - o *Attention : bien homogénéiser entre les pipetages, les billes magnétiques sédimentent rapidement*

Préparer le mélange **Protéinase K, EPC-E** et tampon **T1** :

- Dissoudre la protéinase K dans 2.6mL de protein buffer (PB)
- Bien vortexer
- 1mL de protéinase K + protein buffer
- 0.5mL d'EPC-E(*tubes jaune dans kit qPCR*)
- 10 mL de tampon T1

Distribuer 110 µL du mélange par puits échantillon de la plaque décongelée

Incuber **15 minutes à 56°C**

Transférer 200 µL des puits échantillons dans la **plaque 1**(tampon de capture)

- **Plaque 2** : tampon de lavage **MB3**
 - o Dans une plaque Deepwell, distribuer **350 µL(2x175 µL) de MB3** par puit échantillons
 - o 35mL pour une plaque (100 échantillons)
- **Plaque3** : tampon de lavage **MB4**
 - o Dans une plaque Deepwell, distribuer **350 µL(2x175 µL) de MB4** par puit échantillons
 - o 35mL pour une plaque (100 échantillons)
- **Plaque 4** : lavage **EtOH 80°**
 - o Dans une plaque Deepwell, distribuer **350 µL d'éthanol à 80°** par puit échantillons
 - o 35mL pour une plaque (100 échantillons)
- **Plaque 5** : plaque d'**élution**
 - o Dans une plaque 'petits puits' (KINGFISHER) distribuer **60 µL de tampon MB6** par puits échantillon

- 6mL pour une plaque (100 échantillons)

Couvrir les plaques avec un film plastique

Charger l'automate :

N° sur robot	N° sur programme KF	Type de plaque	Contenance
1	6	Deep Well	Tampon de capture
2	5	Deep Well	MB3
3	4	Deep Well	MB4
4	3	Deep Well	éthanol 80%
5	2	Elution KF96	MB6
6	1	Elution KF96	Peigne de protection

Lancer le programme KF tissue DNA

A la fin du run (25 minutes), protéger la plaque 5 avec un film aluminium et la placer au -80°C

Jeter les réactifs dans un bidon dédié aux produits chimiques

Nettoyer la paillasse avec du DNAway

Amplification

Décongeler et centrifuger la plaque contenant les ADN extraits

Décongeler deux tubes de solution d'amplification A5, et un tube de Para positive control

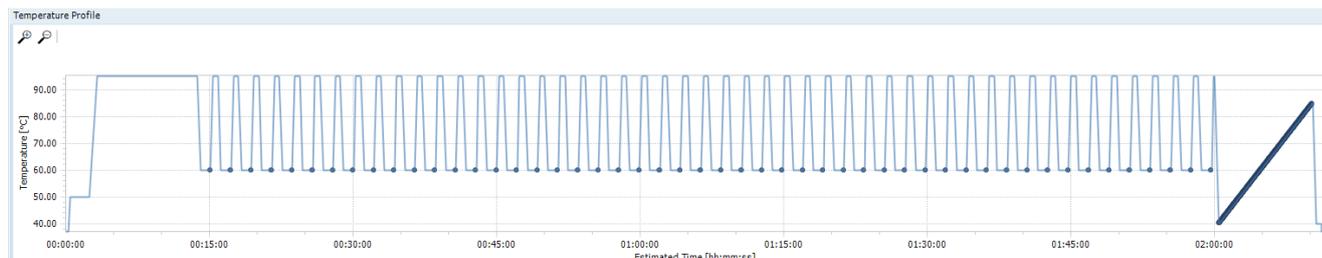
Selon le plan de plaque :

- Distribuer **20 µL de solution d'amplification A5** par puits
- Disposer **5 µL d'eau microfiltrée** dans les puits de Contrôles Négatifs
- Disposer **5 µL de Para positive control** (à reprendre dans 200 µL d'eau) dans les puits de Contrôles Positifs
- Transférer **5 µL d'échantillons**

Filmer la plaque de PCR avec un film KINGFISHER

Lancer le programme dans le LightCycler96 en utilisant deux Dyes FAM + VIC (volume réactionnel 25 µL) :

Nom	Activation Taq	Dénaturation	Amplification 2 étapes		High Resolution Melting		
			1	2	1	2	3
Steps	1	1	1	2	1	2	3
Ramp (°C/s)	4.4	1	4.4	2.2	4.4	2.2	0.1
Duration (s)	120	600	30	60	1	1	1
Target (°C)	50	95	95	60	95	40	85
Mode	/	/	Standard	Standard	/	/	/
Acquisition Mode	None	None	None	Single	None	None	Continuous (5reads/°C)
Nombre de cycles	1	1	50		1		



5 - Nettoyage et élimination des déchets

Le lait et déchets biologiques sont à éliminer en poubelle risque biologique DASTRI rigide.

Les déchets de kits sont à éliminer dans les bidons de tri des déchets liquides appropriés.

6 - Annexes

ANNEXE 1 : Protocole de réalisation de la gamme de dilution de plasmides contrôles

1 - Protocole de réalisation de la gamme de dilution ADN K10

- (a) Nombre de nucléotides de l'ADN de Map : 4 829 781 (Rathnaiah et al. 2017)
- (b) Masse molaire moyenne d'un nucléotide : 330 g/mole
- (c) Nombre d'Avogadro N = $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules/mole
- (d) = $2 \cdot a \cdot b / c$ Masse moléculaire du génome de Map : $5,29511 \times 10^{-15}$ g

Concentration de l'ADN stock de Map : 305.63 ng/μL

Préparation du point standard 1: $5 \cdot 10^6$ Équivalent génome de Map

$5 \cdot 10^6$ équivalents génomes de Map = $d \cdot X \cdot 5 \cdot 10^6 = 2,64755 \times 10^{-8}$ g = 26,4755 ng

On veut $5 \cdot 10^6$ équivalent génome de Map dans 5μL soit $264755 / 5 = 5,29511$ ng/μL

Pour passer de 305.63 ng/μL à 5,29511 ng/μL, il faut diluer 57,72 fois (= $305,63 / 5,29511$)

➔ Diluer 10μL de la solution d'ADN stock K10 initial dans 570 μL d'eau nuclease free

Préparation des points de gamme :

Point 1 : $5 \cdot 10^6$ équivalent génome de Map : diluer 10μL de la solution d'ADN stock K10 initial dans 570 μL d'eau nuclease free.

Point 2 : $5 \cdot 10^5$ équivalent génome de Map : diluer 10 μL du point 1 dans 90μL d'eau

Point 3 : $5 \cdot 10^4$ équivalent génome de Map : diluer 10 μL du point 2 dans 90μL d'eau

Point 4 : $5 \cdot 10^3$ équivalent génome de Map : diluer 10 μL du point 3 dans 90μL d'eau

Point 5 : $5 \cdot 10^2$ équivalent génome de Map : diluer 10 μL du point 4 dans 90μL d'eau

Point 6 : $5 \cdot 10^1$ équivalent génome de Map : diluer 10 μL du point 5 dans 90μL d'eau

Point 7 : 10^1 équivalent génome de Map : diluer 10 μL du point 6 dans 40 μL d'eau

2 – Gamme de dilution plasmide Adiaigène

Concentration initiale : $9 \cdot 10^5$ /μL (soit $25 \cdot 10^4 / 5 \mu\text{L}$ équivalents génomes pour 18 copies IS900 par génome)

Préparation des points de gamme :

Point 1 : $5 \cdot 10^4$ équivalents génomes : diluer 10 μL de la solution pure dans 40 μL d'eau

Point 2 : $5 \cdot 10^3$ équivalents génomes : diluer 10 μL du point 1 dans 90 μL d'eau

Point 3 : $5 \cdot 10^2$ équivalents génomes : diluer 10 μL du point 2 dans 90 μL d'eau

Point 4 : $5 \cdot 10^1$ équivalents génomes : diluer 10 μL du point 3 dans 90 μL d'eau

Point 5 : 5 équivalents génomes (soit $9 \cdot 10^1$ copies de plasmide) : diluer 10 μL du point 4 dans 90 μL d'eau

TOULOUSE 2022

NOM : GONZALEZ

PRENOM : Estelle

TITRE : Excrétion de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* dans le lait chez la vache laitière : étude descriptive et facteurs de risque dans 6 élevages

RESUME : L'excrétion de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (*Map*) dans le lait est l'une des sources de contamination du jeune bovin par l'agent de la paratuberculose. Du fait de similitudes épidémiologiques, lésionnelles et cliniques, de plus en plus d'étude s'accorde sur sa potentielle implication dans le développement de la maladie de Crohn chez l'homme. Même si le lien étiologique reste à prouver, il convient diminuer l'exposition des veaux et des consommateurs. Dans le cadre du plan de lutte contre la paratuberculose bovine mis en place dans la Meuse, cette étude avait pour objectif principal d'évaluer l'effet du vaccin Silirium® sur l'excrétion de *Map* dans le lait. Pour cela, le lait de 142 bovins en deuxième lactation (67 vaccinés et 75 non vaccinés) a été analysé par qPCR dans 6 élevages infectés. Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence un quelconque effet bénéfique de la vaccination sur l'excrétion laitière de *Map*. Par ailleurs, l'influence de certains facteurs (élevage, statut sérologique, et excréteur fécal, stade de lactation, état de santé de la mamelle, âge de la vaccination) sur l'excrétion du bacille ont également été évalués sans qu'aucun lien statistiquement significatif n'ait pu être démontré.

MOTS-CLES : Paratuberculose ; Bovins ; Lait ; qPCR ; *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*.

TITLE: Excretion of *Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis* in dairy cows' milk: descriptive study and risk factors in 6 farms

ABSTRACT: Milk is one of the sources of paratuberculosis infection in calves. Due to epidemiological, lesional and clinical similarities, studies agreed on the potential involvement of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (*Map*) in the development of Crohn's disease in humans. Even if the etiological link remains to be proven, the exposure of calves and consumers must be reduced. Within paratuberculosis control plans implemented in the Meuse department, this study tried to evaluate the effect of the Silirium® vaccine on the excretion of *Map* in milk. For this purpose, the milk of 142 second-lactation cows (67 vaccinated and 75 non-vaccinated) was analysed by qPCR on 6 infected farms. The results did not show any beneficial effect of the vaccination on the excretion of *Map* in milk. In addition, the influence of several factors (serological and faecal shedding status, stage of lactation, udder health, age of vaccination) on *Map* shedding was also evaluated but no significant statistical relationship could be demonstrated.

KEYWORDS: Paratuberculosis; Bovine; Vaccination; Milk; qPCR; *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*.