



Université PARIS EST-CRETEIL



Université PARIS SUD



Ecole nationale Vétérinaire d'Alfort

**MASTER 2<sup>ème</sup> ANNEE**

**Santé publique Paris Sud et Santé UPEC**

**Dominante**

**SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DES MALADIES  
HUMAINES ET ANIMALES**

**RAPPORT DE STAGE**

**Evaluation de l'efficacité du dosage de  
l'interféron gamma associé en série à  
l'intradermotuberculation pour le dépistage de  
la tuberculose bovine**

***“Etude de l'effet de l'injection de tuberculine sur le résultat  
d'un test de dosage de l'IFN réalisé 5 à 8 jours plus tard”***

Présenté par

**Khaled BOUAZIZ**

Réalisé sous la direction de : Mme Anne PRAUD

Organisme et pays : USC EpiMAI (France)

Période du stage : du 04/01/2016 au 15/06/2015

Date de soutenance : 28/06/2016

Année universitaire 2015-2016



# Remerciements

**À Madame Anne Praud,**

Maître de conférences à l'ENVA  
Pour m'avoir orienté et encouragé durant toute la durée de mon stage ; tellement  
compréhensive.

**À toute l'équipe de l'unité EpiMAI,**

Merci de m'avoir accueilli au sein de votre aimable équipe.

**À ma famille,**

Un grand merci à mes sœurs (et leurs maris) et mes frères qui m'ont tout le temps apporté le  
soutien moral.

**À mes amis,**

De près ou de loin, aucun de mes ami (es) n'a manqué de me soutenir : UN ENORME merci  
pour vous tous.

**À ma "Baya",**

Merci pour ton amour, et surtout merci de m'avoir supporté pendant tout ce temps ;-)

# **Pensée**

**À ma ‘maman’ et à mon ‘papa’**

Si seulement vous étiez encore là à mes côtés pour profiter de votre présence

Je vous adore plus que tout.

# Tables des matières

Liste des abréviations .....	5
Liste des figures .....	6
Liste des tableaux .....	7
Introduction .....	8
Introduction .....	
<b>Première partie : Synthèse bibliographique - Notions générales sur la tuberculose bovine et sur les tests de dépistage</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Généralités</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Définition</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Les mycobactéries</b> .....	<b>10</b>
2.1. Classification .....	<b>10</b>
2.2. Pouvoir pathogène et espèces sensibles .....	<b>10</b>
<b>3. Pathogénie</b> .....	<b>11</b>
3.1. La primo infection .....	<b>11</b>
3.2. L'étape secondaire de dissémination .....	<b>11</b>
<b>4. Tableau clinique et lésionnel</b> .....	<b>11</b>
4.1. Tableau clinique .....	<b>11</b>
4.2. Tableau lésionnel .....	<b>12</b>
<b>5. Impacts économique et sanitaire</b> .....	<b>12</b>
5.1. Impact économique .....	<b>12</b>
5.2. Impact sanitaire .....	<b>13</b>
<b>6. Aspect et contexte réglementaires</b> .....	<b>13</b>
<b>II. Epidémiologie de la TB en France</b> .....	<b>13</b>
1. Epidémiologie descriptive .....	<b>13</b>
1.1. Les espèces sensibles à la tuberculose bovine en France .....	<b>13</b>
1.2. Evolution spatio-temporelle de la tuberculose bovine en France .....	<b>14</b>
a) Dans le temps .....	<b>14</b>
b) Dans l'espace .....	<b>14</b>
2. Epidémiologie analytique et synthétique .....	<b>14</b>
2.1. Sources de contagion et modalités de contagion .....	<b>14</b>
2.2. Origines de la contamination .....	<b>14</b>
<b>III. Méthodes de diagnostic / dépistage</b> .....	<b>15</b>
1. Notions de sensibilité et de spécificité des tests .....	<b>15</b>
2. Les tests post-mortem .....	<b>15</b>
2.1. L'examen nécropsique (à l'abattoir) .....	<b>15</b>
2.2. L'histologie .....	<b>15</b>
2.3. La culture .....	<b>15</b>
2.4. La PCR .....	<b>16</b>
2.5. Le typage génétique .....	<b>16</b>
3. Les tests ante-mortem .....	<b>16</b>
3.1. Le diagnostic clinique .....	<b>16</b>
3.2. L'intradermotuberculation .....	<b>16</b>
3.3. Le dosage de l'interféron gamma (IFN) .....	<b>17</b>
<b>IV. Utilisation du dosage de l'IFN<math>\gamma</math> en France</b> .....	<b>19</b>
<b>V. Effet d'une injection de tuberculine sur le résultat d'IFN</b> .....	<b>19</b>

<b>Deuxième partie : contribution personnelle</b> .....	<b>21</b>
<b>I. Contexte de mise en place du protocole expérimental</b> .....	<b>22</b>
<b>II. Matériel et méthodes</b> .....	<b>22</b>
<b>1. Echantillon étudié</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Description du protocole</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Modalités de réalisation des tests de dépistage et de diagnostic</b> .....	<b>24</b>
<b>4. Gestion des données et analyses statistiques</b> .....	<b>26</b>
<b>III. Résultats</b> .....	<b>27</b>
<b>1. Données disponibles</b> .....	<b>27</b>
<b>2. Etude de la validité des tests employés</b> .....	<b>28</b>
2.1. Calcul de la spécificité des tests employés .....	<b>29</b>
2.2. Calcul de la sensibilité des tests employés .....	<b>30</b>
<b>3. Approche de l'influence de l'injection de tuberculine sur les résultats qualitatifs du test de dosage de l'interféron gamma</b> .....	<b>32</b>
3.1. Les animaux indemnes .....	<b>32</b>
3.2. Les animaux infectés .....	<b>35</b>
<b>4. Approche de l'influence de l'injection de tuberculine sur les résultats quantitatifs du test de dosage de l'interféron gamma</b> .....	<b>38</b>
4.1. Chez les animaux indemnes .....	<b>38</b>
4.2. Chez les animaux infectés .....	<b>40</b>
<b>IV. Discussion</b> .....	<b>45</b>
<b>1. Validité interne et externe de l'étude</b> .....	<b>45</b>
<b>2. Caractéristiques des tests de dosage de l'interféron gamma</b> .....	<b>46</b>
2.1. Spécificité .....	<b>46</b>
2.2. Sensibilité .....	<b>46</b>
2.3. Comparaison avec les tests cutanés .....	<b>47</b>
<b>3. Etude de l'effet d'une injection de tuberculine sur les résultats d'un test de dosage de l'interféron gamma effectué 3 à 8 jours plus tard : approche qualitative</b> .....	<b>48</b>
<b>4. Etude de l'effet d'une injection de tuberculine sur les résultats d'un test de dosage de l'interféron gamma effectué 3 à 8 jours plus tard : approche quantitative</b> .....	<b>49</b>
<b>5. Vers une utilisation du test IFN en recontrôle suite à une IDT non négative sur le terrain ?</b> .....	<b>50</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>51</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>52</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>74</b>

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>AM</b>	Arrêté Ministériel
<b>ATC</b>	Anticorps
<b>BCG</b>	Bacille de Calmette et Guérin
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>CFP10</b>	<i>Culture Filtrate Protein</i> , protéine de 10 kDa
<b>CE</b>	Commission Européenne
<b>DDCSP</b>	Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations
<b>DDecPP</b>	Direction Départementale en charge de la Protection des Populations
<b>DGAI,</b>	Direction Générale de l'Alimentation
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (méthode de dosage immuno-enzymatique)
<b>ENVA</b>	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
<b>EpiMAI</b>	Epidémiologie des maladies animales infectieuses
<b>ESA</b>	Epidémiosurveillance en santé animale
<b>ESAT6</b>	<i>Early secretory antigenic target</i> , protéine de 6 kDa
<b>FP</b>	<i>Faux positif</i>
<b>FN</b>	<i>Faux négatif</i>
<b>IC95 %</b>	Intervalle de confiance a 95 pour cent
<b>IDT</b>	intradermotuberculation
<b>IDS</b>	Intradermotuberculation simple
<b>IDC</b>	Intradermotuberculation comparative
<b>IFN</b>	Interféron gamma
<b>J</b>	Jour
<b>LNR</b>	Laboratoire National de Référence
<b>LTc</b>	les lymphocytes T cytotoxiques
<b>M.</b>	Mycobacterium
<b>MAC</b>	Mycobacterium avium complexe
<b>MTBC</b>	Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>N°</b>	Numéro
<b>NC</b>	Non-conclusif (l'un des trois résultats possibles au test de dosage de l'interféron)
<b>NEG</b>	Négatif
<b>NON NEG</b>	Non-négatif
<b>OIE</b>	organisation mondiale de la santé animale
<b>OVF</b>	Office Vétérinaire Fédéral
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PPD</b>	<i>Purified Protein Derivated</i> (traduction de l'anglais : dérivé protéique purifié, noté <i>PPDs</i> au pluriel)
<b>PPDA</b>	PPD préparé à partir de tuberculine aviaire
<b>PPDB</b>	PPD préparé à partir de tuberculine bovine
<b>PC-EC</b>	Peptide Cocktail- ESAT-6 CFP-10
<b>p</b>	Degré de signification (d'un test statistique)
<b>RIMC</b>	Réponse Immunitaire a Médiation Cellulaire
<b>RIMH</b>	Réponse Immunitaire a Médiation Humorale
<b>SI</b>	système immunitaire
<b>SIDA</b>	Syndrome d'Immunodéficience Acquis
<b>Sp</b>	Spécificité (d'un test)
<b>Se</b>	Sensibilité (d'un test)
<b>SR</b>	Suivi Renforcé
<b>SIGAL</b>	Système d'Information de la DGAI
<b>TB</b>	Tuberculose Bovine
<b>Th1</b>	Les cellules T (en anglais T helper)
<b>TN</b>	Témoins Négatif
<b>TP</b>	Témoins Positif

VP	Vrai positif
VN	Vrai négatif

## Liste des Figures

<b>Figure 01</b> : Présentation graphique du spectre de réponse immunitaire au test de dosage de l'IFN $\gamma$ et de l'IDT (RIMC) ainsi qu'aux tests sérologiques (RIMH) des bovins infectés par <i>M. bovis</i> en fonction du temps et du spectre pathologique (d'après de la Rua-Domenech et al., 2006) .....	<b>18</b>
<b>Figure 02</b> : Schéma décisionnel dans le cadre du protocole expérimental en cas de suspicion faible due à l'obtention d'une IDC ou IDS initiale douteuse et un résultat à l'IFN $\gamma$ non conclusif .....	<b>23</b>
<b>Figure 03</b> : Schéma décisionnel dans le cadre du protocole expérimental en cas de suspicion forte due à l'obtention d'une IDC initiale positive ET à l'obtention d'une IDS initiale non négative ou une IDC douteuse...	<b>24</b>
<b>Figure 04</b> : Répartition des 118 animaux indemnes inclus dans le cadre de protocole dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude, suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2 .....	<b>32</b>
<b>Figure 05</b> : Répartition des 118 animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude dans les trois catégories de profils de résultats IFN .....	<b>33</b>
<b>Figure 06</b> : Répartition des 292 animaux indemnes en SR dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2 .....	<b>34</b>
<b>Figure 07</b> : Répartition des 292 animaux indemnes en SR dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude dans les trois catégories de profils de résultats IFN .....	<b>34</b>
<b>Figure 08</b> : Répartition des 21 animaux infectés inclus dans le cadre de protocole suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2 .....	<b>35</b>
<b>Figure 09</b> : Répartition des 21 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole dans les trois catégories de profils de résultats IFN .....	<b>35</b>
<b>Figure 10</b> : Répartition des 10 animaux infectés inclus dans le cadre de protocole dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2 .....	<b>10</b>
<b>Figure 11</b> : Répartition des 18 animaux infectés en SR suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2 .....	<b>11</b>
<b>Figure 12</b> : Répartition des 18 animaux infectés en SR dans les trois catégories de profils de résultats IFN .....	<b>37</b>
<b>Figure 13</b> : Répartition des neuf animaux infectés en SR dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2 .....	<b>37</b>
<b>Figure 14</b> : Valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 118 animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole et dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude .....	<b>39</b>
<b>Figure 15</b> : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 292 animaux indemnes en SR et dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude .....	<b>40</b>
<b>Figure 16</b> : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 21 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole .....	<b>41</b>
<b>Figure 17</b> : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par	<b>42</b>

des antigènes spécifiques (MIX) pour les 10 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole et dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude .....

**Figure 18** : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 18 animaux infectés en SR ..... **43**

**Figure 19** : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 9 animaux infectés inclus en SR et dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude ..... **44**

## Liste des tableaux

**Tableau 01** : Réponses exactes et réponses erronées à un test de dépistage (Toma B. et al., 2001) ..... **15**

**Tableau 02** : Critères de validation de la qualité de l'échantillon et de la technique ELISA permettant une interprétation ultérieure du test ..... **18**

**Tableau 03** : Seuils de positivité avant et après correction sur la base des résultats de la première campagne du protocole, fournis par le LNR ..... **25**

**Tableau 04** : Interprétation des résultats des tests IFN selon les nouveaux seuils de positivité fournis par le LNR ..... **26**

**Tableau 05** : Répartition des animaux inclus dans le protocole expérimental selon le département de provenance et le statut infectieux des animaux ..... **28**

**Tableau 06** : Résultats des quatre tests chez les 811 animaux indemnes ayant obtenu un résultat non négatif en IDT1 ..... **29**

**Tableau 07** : Résultats des quatre tests chez les 942 animaux indemnes inclus dans le protocole et ayant obtenu des résultats non négatifs en IDT1 ..... **29**

**Tableau 08** : Résultats des quatre tests chez les 48 animaux indemnes en SR et ayant obtenu un résultat non négatif en IDT1 ..... **30**

**Tableau 09** : Résultats des quatre tests chez les 26 animaux infectés ayant obtenu un résultat non négatif à l'IDT1 ..... **30**

**Tableau 10** : Résultats des quatre tests chez les 21 animaux infectés inclus dans le protocole ..... **31**

**Tableau 11** : Résultats des quatre tests chez les cinq animaux infectés inclus en SR et ayant obtenu des résultats non négatifs en IDT1 ..... **31**

**Tableau 12** : Paramètres statistiques des ratios PPD et MIX pour les 118 bovins indemnes inclus dans le cadre du protocole, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude ..... **38**

**Tableau 13** : Paramètres statistiques des ratios PPD et MIX pour les 292 bovins indemnes en SR, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude ..... **39**

**Tableau 14** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 21 bovins infectés inclus dans le cadre du protocole ..... **40**

**Tableau 15** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 10 bovins infectés inclus dans le cadre du protocole, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude ..... **41**

**Tableau 16** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 18 bovins infectés en SR ..... **42**

**Tableau 17** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 9 bovins infectés en SR, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude ..... **43**

# INTRODUCTION

La tuberculose est connue depuis l'Antiquité grecque (les premières descriptions de tuberculose humaine furent retrouvées notamment à travers les écrits d'Hippocrate). La tuberculose bovine est une maladie infectieuse, contagieuse et cosmopolite due à une bactérie ubiquitaire : *Mycobacterium bovis*. Cet agent zoonotique est transmissible à de nombreuses espèces animales, domestiques et sauvages.

Cette maladie était fréquente en France notamment dans les années 1950, où 20 à 50 % des cheptels étaient tuberculeux avec de lourdes pertes économiques (BENET J, 2001). Les cas de tuberculose humaine dus à *M. bovis* demeuraient fréquents en raison de l'absence de pasteurisation du lait à cette époque. C'est dans ce contexte que les actions de lutte et de prévention collective se sont mises en place.

La France est reconnue officiellement indemne de tuberculose bovine depuis décembre 2000. Depuis, la lutte repose sur la surveillance sanitaire des cheptels grâce au contrôle périodique de l'état sanitaire des troupeaux par des tests cutanés, à des contrôles à l'introduction lors de mouvements d'animaux et à l'inspection systématique des carcasses à l'abattoir. Cependant, depuis 2004, un certain nombre de nouveaux foyers sont mis en évidence dans plusieurs départements français notamment la Côte-d'Or et la Dordogne.

L'obstacle majeur pour l'éradication de la maladie réside dans la difficulté à la diagnostiquer. Les tests cutanés (intradermotuberculinations) sont les seules techniques reconnues réglementairement au sein de l'Union Européenne pour le dépistage de la tuberculose bovine. Or ces tests cutanés présentent de nombreux inconvénients pratiques et leurs sensibilités et spécificités sont imparfaites. De même, les protocoles réglementaires actuels imposent le blocage des troupeaux suspects : en cas de résultats non négatifs au dépistage, l'élevage concerné est considéré comme suspect et est bloqué durant six semaines afin de conduire des investigations complémentaires telles que la réalisation d'intradermotuberculinations comparatives, ce qui pose un problème économique considérable en cas de résultats faussement positifs.

Dans un cadre d'amélioration du dépistage concernant notamment cette durée d'attente, les autorités françaises souhaiteraient pouvoir utiliser le test à l'interféron associé en série à l'intradermotuberculination, quelques jours après l'obtention d'un résultat non négatif au test cutané. Toutefois, cet usage n'est pas autorisé par la réglementation européenne (Directive CE 64/432). Les premiers essais réalisés depuis 2008 dans quelques départements français ne respectaient pas la réglementation européenne et n'ont pas permis d'aboutir à des conclusions valides en raison du faible nombre d'animaux inclus. Un protocole expérimental a donc été mis en œuvre par la DGAI, avec l'accord de la Commission Européenne, afin d'étudier la possibilité d'utiliser le dosage d'interféron pour le recontrôle des animaux ayant obtenu des résultats non négatifs aux tests cutanés de première intention, en remplacement de l'intradermotuberculination comparative.

Notre étude s'appuie sur les résultats de ce protocole expérimental mené lors de deux campagnes de prophylaxie (2013-2014 et 2014-2015). L'objectif du protocole consistait à répondre aux questions suivantes :

Pourrait-on vraiment envisager de remplacer l'intradermotuberculination comparative (IDC) réalisée 42 jours suite à l'obtention d'un résultat non-négatif à l'intradermotuberculination simple (IDS) par un dosage d'interféron gamma (IFN) juste après la lecture de l'IDS ? Ce dosage de l'IFN pratiqué le jour de la lecture des résultats de l'IDS (J3) est-il au moins aussi sensible que l'IDC de recontrôle à J42 recommandée par la réglementation européenne (Directive CE 64/432) ? Notre thématique de stage portait de manière plus particulière sur la problématique suivante : Existe-il une influence des tests cutanés sur les résultats d'un test à l'interféron réalisé quelques jours après l'injection de tuberculine ?

**Première partie : Synthèse  
bibliographique - Notions générales sur  
la tuberculose bovine et sur les tests de  
dépistage**

# I. Généralités

## 1. Définition de la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse, d'évolution chronique, transmissible à de nombreux mammifères dont l'homme, liée à la présence d'une bactérie qui peut engendrer des lésions au sein de nombreux organes.

La tuberculose bovine (TB) est due principalement à une bactérie appelée *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) et parfois à *M. tuberculosis* (LoBue *et al.*, 2010) ou *M. caprae*. Elle provoque une détérioration de l'état général et, à terme, entraîne la mort. *M. avium* peut également provoquer une infection bénigne chez le bovin, mais elle n'est pas à l'origine d'une tuberculose. Les nodules, encore appelées "tubercules" se forment au niveau des organes des animaux atteints, d'où le nom « tuberculose » (Bénet et Praud, 2011).

## 2. Les mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies, elles possèdent des complexes lipidiques supplémentaires leur permettant d'avoir une persistance intracellulaire et d'être acido-alcool-résistantes (bactéries gram-positif). Leur identification est possible au microscope, grâce à la coloration de Ziehl-Nielsen, qui permet de les mettre en évidence.

Les mycobactéries persistent longuement dans le milieu extérieur (sécrétions séchées, litière). Elles sont néanmoins rapidement détruites par les rayons ultra-violet et les températures supérieures à 65°C. Ainsi, la pasteurisation du lait permet de les neutraliser (Confédération suisse, OVF, 2011).

### 2.1. Classification

Parmi les classifications des mycobactéries existantes, une classification basée sur le pouvoir pathogène est régulièrement utilisée. On retrouve ainsi, trois groupes de mycobactéries : Les Mycobactéries pathogènes, les Mycobactéries opportunistes et les Mycobactéries saprophytes. (Rojas-espinosa et Lovik, 2001). On distingue deux complexes parmi les Mycobactéries pathogènes: le complexe tuberculosis ou MTC (« *Mycobacterium Tuberculosis Complex* ») et le complexe avium ou MAC (« *M. Avium intraCellulare* »). La dénomination de « bacilles tuberculeux » comprend les deux complexes MTBC et MAC (Bénet et Praud, 2015). L'**annexe (I)** illustre la proximité phylogénétique entre les espèces de mycobactéries pathogènes.

### 2.2. Pouvoir pathogène et espèces sensibles

Les bovins constituent l'hôte préférentiel pour *Mycobacterium bovis*, mais est transmissible à de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages (Humblet *et al.*, 2009 ; Biet *et al.*, 2005). C'est la mycobactérie la plus ubiquiste du complexe *tuberculosis*, rencontrée chez les ongulés, les canidés, les félidés, les petits mammifères et de nombreuses autres espèces. Les bovins sont également réceptifs à certaines bactéries du complexe MAC (exemple: *Mycobacterium avium*), cependant, les infections qui en découlent sont généralement bénignes et guérissent de manière spontanée. Les différentes mycobactéries pathogènes du complexe MTC sont représentées dans l'**annexe II**, d'après Rodriguez *et al.*, 2014. Ainsi, il semble donc pertinent de déterminer son espèce, lorsqu'une Mycobactérie est isolée afin d'établir si elle possède un pouvoir pathogène pour l'espèce animale porteuse et son pouvoir zoonotique éventuel.

La tuberculose bovine due à *M. bovis* peut se transmettre à l'homme par différentes voies, principalement par inhalation et par ingestion (notamment de lait non pasteurisé). Il faut donc considérer qu'il existe toujours un risque de contamination pour les éleveurs, les vétérinaires, les consommateurs en cas de foyers de tuberculose. C'est pourquoi, malgré les méthodes de dépistage ainsi que la surveillance sanitaire, la transmission de *M. bovis* des bovins à l'Homme restant possible, *M. bovis* représente toujours potentiellement un risque pour la santé publique en France. Cependant, la tuberculose en tant que zoonose est rare en France. Ce n'est pas le cas dans des pays où la lutte contre la tuberculose bovine est moins organisée, et où l'on estime le taux de tuberculose humaine d'origine animale à 30% (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Concernant l'état actuel de la tuberculose humaine, les données du rapport de 2013 de l'OMS sur la tuberculose humaine donnent les chiffres suivants : on estime que 8,6 millions de personnes ont contracté cette maladie et 1,3 millions en sont morts.

### 3. Pathogénie

La pathogénie de la tuberculose n'a été décrite que récemment et certains phénomènes restent à l'étude (LoBue *et al.*, 2010). On distingue deux étapes :

#### 3.1. La primo infection

On parle de primo infection lorsque le système immunitaire (SI) n'a jamais rencontré le *Mycobacterium bovis*. Après pénétration dans l'organisme, les bacilles tuberculeux sont rapidement phagocytés par les macrophages au niveau de la voie d'entrée qui est principalement la voie respiratoire. Une partie est détruite tandis qu'une autre résiste à la lyse macrophagique par inhibition de la fusion phagosome-lysosome, puis se multiplie dans les macrophages. (Bénet et Praud, 2015 ; Chatenoud et Bach, 2012). A ce stade, les bacilles sont protégés des composants bactéricides extracellulaires. (Robinson *et al.*, 2012). Une réponse immunologique à médiation cellulaire (RIMC) se met en place suite à cette multiplication et une lésion initiale se crée en 8 à 15 jours, appelée le chancre d'inoculation. Cette lésion prend la forme d'un granulome nodulaire non vasculaire ou tubercule qui limite la dissémination des bacilles. Les cellules T vont interagir avec les macrophages et synthétiser de l'interféron gamma (IFN). Principalement sécrétées par les lymphocytes Th1, les cellules *Natural killer* (NK) et les lymphocytes T cytotoxiques (LTc). L'INF est principalement induit par les antigènes et sa fonction essentielle est l'activation des cellules NK, des macrophages et des LTc (Robinson *et al.*, 2012 ; McGill *et al.*, 2014). La seule phase de RIMC, qui vise à limiter la dissémination des bacilles dans l'organisme, ne suffit pas à contenir l'infection. Dans un deuxième temps, comme l'illustre l'**annexe III**, une réponse immunitaire à médiation humorale (RIMH) se développe au bout de quelques semaines à quelques mois, en fonction de la quantité de bacilles et de la rapidité de la mise en place de l'infection. On assiste alors au recrutement des lymphocytes B. Le granulome se calcifie (au bout de deux semaines en moyenne), puis le foyer se nécrose et se retrouve entouré d'un tissu de granulation, de monocytes et de cellules plasmiques formant une lésion tuberculeuse. Enfin, les bacilles disséminent par voie lymphatique et entraînent une adénopathie du nœud lymphatique loco-régional. (Bovine tuberculosis 2008 ; Robinson *et al.*, 2012).

#### 3.2. L'étape secondaire de dissémination

Le complexe primaire peut évoluer selon trois modalités: (i) la guérison de l'animal, avec destruction des bacilles tuberculeux et cicatrisation des lésions, (ii) la stabilisation de l'infection et (iii) la généralisation précoce de la tuberculose par multiplication active des mycobactéries et embolisation. Dans les deux derniers cas, on aboutit à une tuberculose chronique qui fait généralement suite à un affaiblissement de l'état général de l'animal (Thorel *et al.*, 2003 ; Bénet et Praud, 2015). Cette évolution dépend surtout de la quantité de bacilles tuberculeux inoculée, de l'état général de l'animal et de son âge. En effet, les lésions sont plus fréquentes et plus graves chez les jeunes ou chez les animaux âgés.

En cas d'absence de guérison, les lésions initiales peuvent proliférer de proche en proche tout en restant localisées dans un même organe. On parle alors de tuberculose chronique d'organe. Cette prolifération est causée par une recontamination endogène ou exogène de l'organe. Dans ce cas-là, il peut ne pas y avoir de lésions sur les nœuds lymphatiques adjacents. Dans les cas de formes ouvertes, les lésions s'ouvrent sur une voie de drainage, ce qui peut aboutir à une stabilisation ou à une généralisation. La généralisation peut se faire sous la forme de quelques lésions nodulaires dans différents organes, ou sous une forme plus sévère, la tuberculose miliaire. Les signes cliniques sont variables en fonction des organes atteints et de la progression de la maladie mais dans tous les cas il y a une toxémie sous jacente qui se traduit par une faiblesse, voire éventuellement la mort de l'animal. (Radostits *et al.*, 2007 ; Benet, 2008).

### 4. Tableau clinique et lésionnel

La tuberculose est une maladie à évolution chronique. Les signes cliniques et lésionnels (**annexe IV**) sont variables en fonction des organes atteints et peu spécifiques (Thorel, 2003).

#### 4.1. Tableau clinique

« Il y a plus d'infectés que de malades », tel est l'affirmation la plus courante actuellement, à cause de l'incubation longue de la TB et de son évolution lente ce qui rend les symptômes frustes (Bénet, 2010).

Chez le jeune, on peut parfois noter un retard de croissance. Concernant les adultes, les formes cliniques classiques sont peu observées. Les animaux gravement atteints sont souvent cachectiques et abattus avec un poil piqué, une baisse d'appétit, une enophtalmie et une hyperthermie inconstante. Ils meurent soit consécutivement à l'atteinte de certains organes par la maladie, soit par épuisement. (Gourreau *et al.*, 2012). Chez les animaux adultes, pour les cas les plus graves, un amaigrissement (muscles atrophiés, côtes saillantes), un poil terne et piqué et une peau sèche peuvent être observés. L'évolution de la température corporelle peut devenir irrégulière et aller jusqu'à 41°C. L'appétit devient capricieux. Du météorisme et des diarrhées peuvent être observés. En fin d'évolution, l'état général peut être sévèrement atteint avec un amaigrissement, voire une cachexie marquée des animaux (Thorel M. F., 2003). D'autres symptômes peuvent être associés à l'atteinte de l'état général, mais les manifestations cliniques restent peu caractéristiques (Thorel M. F., 2003). La plus fréquente est une tuberculose pulmonaire (80 % des cas) avec de la toux, un jetage (jaunâtre et fétide), une respiration anormale (courte, rapide et saccadée).

## 4.2. Tableau lésionnel

**Macroscopique :** Les lésions sont appelées « tubercules ». Il s'agit de granulations de la taille d'une tête d'épingle pouvant devenir plus volumineux. Le centre du tubercule est composé d'une substance blanche jaunâtre appelé caséum (Thorel, 2003).

C'est au niveau des viscères que l'on observe principalement ces lésions. Avec dans l'ordre décroissant de fréquence : les poumons en majorité, la plèvre, le péritoine et le foie. Les nœuds lymphatiques voisins principalement touchés sont : les nœuds lymphatiques trachéo-bronchiques et médiastinaux, les rétropharyngiens et les mésentériques. Ces lésions nodulaires évoluent vers l'infiltration (caséum), puis la calcification et peuvent aller jusqu'à l'ulcération et l'épanchement (forme ouverte de tuberculose).

**Microscopique :** Une inflammation non spécifique se met en place : congestion active, œdème, apparition de cellules inflammatoires sur le site d'infection et activation des macrophages. Selon la réaction de l'hôte, le bacille peut être détruit ou persister. Quand l'antigène introduit ne peut être éliminé, il y a formation d'un granulome ou follicule tuberculeux (réaction inflammatoire spécifique). Ce follicule est composé de macrophages (avec un aspect de cellules géantes ou syncytium), de fibroblastes et de polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles en proportions variables, le tout organisé en couronne autour d'un centre nécrotique homogène. Ces cellules sont entourées ensuite de fibres collagènes et d'un dépôt calcium selon le stade d'évolution (Bach, 1993).

## 5. Impacts économique et sanitaire

La TB est un fléau majeur de l'élevage bovin en zone infectée. Elle représentait un problème de santé publique majeure en Europe (avant la mise en place des mesures de contrôle). Sur le plan économique, en plus des pertes en viande et en lait, elle entrave le commerce intérieur et extérieur (Bénet et Praud, 2015).

### 5.1. Impact économique

Les conséquences économiques pour un éleveur dont le troupeau est touché par la tuberculose regroupent des pertes par saisies à l'abattoir, une diminution de la production laitière (pour un élevage laitier), mais surtout, et c'est l'impact majeur actuellement, une restriction des mouvements d'animaux et de leur vente, ainsi que l'abattage total (ou éventuellement partiel) du troupeau déclaré infecté. En effet, la commercialisation des animaux est réglementée par la Directive 64/432/CEE. Cette directive européenne établit les conditions à remplir pour la vente et le transport des animaux, notamment la qualification « indemne de tuberculose bovine » pour les élevages concernés au sein de l'Union Européenne (ex. : article 6. 2. a)).

Les dépenses dans le cadre de la surveillance épidémiologique et de la gestion de la tuberculose bovine en France ne sont pas négligeables. En 2013, elles ont été estimées à 19,2 millions d'euros et étaient réparties de la manière suivante : indemnités des éleveurs touchés, frais de laboratoires pour les analyses prises en charge par l'État honoraires des vétérinaires sanitaires (Fediaevsky A. *et al.*, 2013, 2014). La moyenne nationale a été évaluée à 139 000 euros par foyer mais il existe des différences régionales et départementales importantes (ex. : Bourgogne, Camargue, Dordogne) du fait de situations épidémiologiques différentes (Fediaevsky *et al.*, 2010). En Dordogne, le

montant des indemnités en 2009 s'est élevé à 3,1 millions d'euros (données DDCSPP 24). La surveillance de la faune sauvage quand elle a lieu, correspond à des dépenses supplémentaires engagées par l'État. Elles sont estimées globalement en 2013 à un million d'euros (Fediaevsky *et al.*, 2014).

## 5.2. Impact sanitaire

La tuberculose bovine est transmissible à de nombreuses espèces animales et à l'Homme. Elle fait partie des dangers sanitaires de première catégorie (anciennement nommés maladies réputées contagieuses). Maladie très répandue en France au XX<sup>ème</sup> siècle (25% des cheptels bovins étaient infectés en 1955), son impact zoonotique était très important puisque la transmission à l'homme est possible par contact avec les bovins tuberculeux ou par consommation de produits au lait cru contaminé. Cet impact sanitaire de la tuberculose humaine est moindre depuis les mesures prises de pasteurisation du lait et d'éradication de la tuberculose au sein des élevages bovins. Cependant, elle reste un problème de santé publique.

Cette maladie peut provoquer chez l'homme des atteintes pulmonaires et extra-pulmonaires (adénite cervicale, infections génito-urinaires, tuberculose osseuse...). Les formes cliniques les plus courantes de tuberculose humaine à *M. bovis* sont les formes pulmonaires et génito-urinaires. La forme clinique de la tuberculose humaine à *M. bovis* n'est pas différenciable de celle à *M. tuberculosis* (Acha et Szyfres, 2005).

## 6. Aspect et contexte réglementaires

La tuberculose est classée, suivant l'arrêté ministériel du 29 juillet 2013, parmi les dangers sanitaires de première catégorie. Plus particulièrement, les dangers reconnus par le législateur sont *M. bovis*, *M. caprae* et *M. tuberculosis*, et ce, pour toutes les espèces de mammifères. La tuberculose bovine est une maladie listée par l'OIE (organisation mondiale de la santé animale), elle doit donc être déclarée au niveau international. Ainsi les membres de l'OIE sont tenus de mettre à la disposition des autres membres, par l'intermédiaire de notification à l'OIE, toute information nécessaire pour enrayer la propagation des maladies animales importantes et permettre une meilleure prophylaxie de ces maladies au plan mondial (Ganière, 2014). La France a été reconnue Etat officiellement indemne de tuberculose bovine par l'Union européenne en décembre 2000 (Décision (C2000)-4064).

Le Décret du 19 mars 1963 a posé les bases de la lutte contre la tuberculose bovine en s'appuyant sur une organisation collective et volontaire de la prophylaxie sous l'impulsion et la supervision des services vétérinaires. La lutte fut rendue obligatoire sur l'ensemble du territoire national en 1965 (Arrêté Ministériel (AM) du 23 juin 1965). Actuellement, les mesures techniques et administratives de lutte relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose bovine sont définies par l'AM du 15 septembre 2003, modifié le 2 septembre 2014 (**annexe V**). C'est dans ce texte que sont établis les principes réglementaires relative aux principes de lutte contre la tuberculose bovine : (i) l'organisation de la prophylaxie (recherche des animaux tuberculeux et définition sanitaire d'un animal ou troupeau indemne, suspect, infecté ou contaminé de tuberculose) et (ii) les dispositions applicables en cas de suspicion ou de confirmation de l'infection dans un cheptel (mesures applicables dans les troupeaux suspects, susceptibles ou infectés) (Bénet et Praud, 2015)

## II. Epidémiologie de la TB en France

### 1. Epidémiologie descriptive

#### 1.1. Les espèces sensibles à la tuberculose bovine en France

Plusieurs espèces de mammifères domestiques ou sauvages peuvent être affectées par *Mycobacterium bovis* tel que les bovins, les ovins, les caprins, les porcins, les lapins, les chats, les chiens, les cervidés sauvages, les buffles, les blaireaux, les opossums, les bisons, les éléphants et les primates. (O'Reilly et Daborn, 1995 ; LoBue *et al.*, 2010). Bien que les ovins et les caprins soient rarement contaminés, ils permettent le cas échant de révéler la présence de *M. bovis* dans l'environnement des élevages. Toutefois, l'espèce bovine (*Bos taurus*) semble être l'espèce la plus sensible (Clifton-Hadley *et al.*, 2000).

Des cas d'infection ont été décrits à plusieurs reprises chez les espèces de mammifères présentes dans la faune sauvage française : sanglier (*Sus scrofa*), cerf élaphe (*Cervus elaphus*), blaireau (*Meles meles*), renard roux ou commun (*Vulpes vulpes*) (Delahay *et al.*, 2007).

## **1.2. Evolution spatio-temporelle de la tuberculose bovine en France**

### **a) Dans le temps**

Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, la tuberculose était très présente en France. Le taux d'atteinte moyen dans les exploitations était de 30 à 40 % des animaux, ce qui représentait 8 à 10 % du cheptel national bovin infecté de tuberculose à cette époque (Benet *et al.*, 2006). L'organisation de la lutte contre cette maladie et la mise en place d'une prophylaxie ont permis son déclin. Grâce à la mise en place de ces mesures à l'échelle de l'animal d'abord puis du troupeau, le taux de prévalence pour les cheptels estimé à 25% en 1955, est descendu à 10% en 1965, 1% en 1980, et moins de 0,1% à partir de 1994. Cette diminution a permis d'aboutir en 2001 à l'obtention du statut « pays officiellement indemne de tuberculose » au niveau européen, toujours d'actualité depuis puisque le taux de prévalence nationale reste chaque année en dessous du seuil de 0,1%. Cependant, comme le montre l'**annexe VI**, on observe qu'à partir de 2005, les taux de prévalence et d'incidence ont ré-augmenté, le nombre d'élevages infectés se situant après stabilisation autour de 150. Ainsi, la proportion de troupeaux infectés s'élevait à moins de 0,05 % en 2000 tandis qu'elle est actuellement d'environ 0,07 %. On observe que l'augmentation est particulièrement marquée de 2009 à 2010. Ce phénomène est à rattacher à la mise en place de la prophylaxie renforcée en Côte-d'Or entre 2009 et 2011. Le dépistage a permis de détecter de nombreux foyers à des stades d'évolution qui semblent relativement précoces par rapport aux années antérieures. On peut donc supposer que ces mesures ont contribué à révéler des foyers non détectés jusque-là qui permettaient d'entretenir la circulation de l'infection à bas bruit (Fediaevsky *et al.*, 2011, 2012, 2013, 2014).

### **b) Dans l'espace**

Actuellement, la distribution de la tuberculose bovine sur le territoire national est hétérogène et on note plus d'une quinzaine de départements recensent encore des cas de tuberculose bovine en 2010 (**annexe VI**). On observe de fortes prévalences et incidences en Côte d'Or et Dordogne en particulier, ainsi que dans les Pyrénées Atlantiques et la Camargue dans une moindre mesure. Cette évolution est due à plusieurs départements qui présentent une recrudescence de cas de tuberculose bovine, en particulier la Côte d'Or, la Dordogne et les Pyrénées-Atlantiques (Dufour *et al.*, 2011).

## **2. Epidémiologie analytique et synthétique**

### **2.1. Sources de contagion et modalités de contagion**

Les individus tuberculeux constituent la source principale de contagion, qu'ils soient malades ou simplement infectés (porteurs de lésions mais sans symptôme). L'excrétion du bacille tuberculeux est précoce (avant l'apparition des signes cliniques), durable, importante (surtout pour les formes ouvertes de la maladie) et irrégulière. Les matières virulentes sont les sécrétions respiratoires, les fèces, le lait, le sperme, les sécrétions utérines, l'urine ou encore les viscères. Le bacille est très résistant dans le milieu extérieur souillé par les excréments virulents (ex. : résistance dans les bouses jusqu'à 5 mois en hiver) et dans les produits d'origine animale comme le lait (Bénet, 2010).

La transmission est exclusivement horizontale. Elle peut être directe par contact entre individus (cohabitation dans des locaux confinés, animaux vivant en lots en pâture ou encore contacts entre les pâtures...) ou indirecte par contact avec le milieu extérieur contaminé (front d'ensilage, bol de complément minéral vitaminé, pierre à lécher, palette d'abreuvoir...) (Bénet, 2010).

### **2.2. Origines de la contamination**

L'élevage bovin a des nombreuses interactions avec l'extérieur. L'origine probable de la tuberculose bovine dans un cheptel peut s'expliquer par trois facteurs : (i) L'introduction d'un nouvel animal (achat, prêt d'un animal ou une mise en pension) dans le cheptel est un facteur de risque puisqu'il peut être infecté et ainsi apporter la maladie dans l'élevage. (ii) Le voisinage avec prêt ou échange de matériel entre éleveurs, ou encore les contacts entre les animaux au pâturage sont autant de risques de contamination pour un élevage indemne. Les contacts avec la faune sauvage sont également à prendre en considération. (ii) La résurgence peut être à l'origine d'une nouvelle infection au sein de l'élevage (persistance du germe dans l'environnement suite à une mauvaise décontamination, après un premier foyer de tuberculose). En effet, la tuberculose est une maladie enzootique dont l'extension est lente et insidieuse au cours des mois et des années. Elle peut s'incruster et demeurer inaperçue pendant une longue période (Bénet, 2010).

### III. Méthodes de diagnostic / dépistage

#### 1. Notions de sensibilité et de spécificité des tests

Les caractéristiques des tests de dépistage sont définies par des valeurs dites « intrinsèques », qui dépendent uniquement du test et des valeurs dites « extrinsèques », qui dépendent des conditions de mise en œuvre du test. En fonction de la qualité du test et de la réponse biologique des individus, un test peut produire des réponses exactes mais aussi erronées (Toma B. *et al.*, 2001). Le **tableau 01** suivant expose les réponses exactes et les réponses erronées à un test de dépistage appliqué à des individus.

**Tableau 01** : Réponses exactes et réponses erronées à un test de dépistage (Toma B. *et al.*, 2001)

		Situation réelle	
		Infectés	Indemnes
Résultats du test de dépistage	Positif	Vrais positifs (VP)	Faux positifs (FP)
	Négatif	Faux négatifs (FN)	Vrais négatifs (VN)

La sensibilité d'un test de dépistage ( $Se$ ) correspond à son aptitude à identifier correctement les animaux infectés grâce à une réponse positive. Elle correspond à la proportion de vrais positifs (VP) sur l'ensemble des infectés (VP+FN) soit  $Se = VP/(VP+FN)$ . La spécificité d'un test de dépistage ( $Sp$ ) correspond à son aptitude à identifier correctement les animaux indemnes grâce à une réponse négative. Elle correspond à la proportion de vrais négatifs (VN) sur l'ensemble des indemnes (VN+FP) soit  $Sp = VN/(VN+FP)$ . La sensibilité et la spécificité ne dépendent pas de la fréquence d'une maladie, il s'agit donc de valeurs « intrinsèques » du test. Le choix d'une bonne sensibilité se fait au détriment de la spécificité et réciproquement (Toma B. *et al.*, 2001).

#### 2. Les tests post-mortem :

##### 2.1. L'examen nécropsique (à l'abattoir)

L'inspection post-mortem est une mesure de surveillance primordiale. Elle est standardisée et ses modalités sont décrites dans le règlement européen n°854 de 2004, qui fixe les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

La nature des lésions varie selon le stade de l'infection. Les lésions recherchées par le vétérinaire inspecteur sont nodulaires (tubercule), de couleur grise à jaunâtre, de taille variant de quelques millimètres à plusieurs centimètres et de consistance caséuse, caséo-calcaire ou calcifiée. La localisation la plus fréquente de la tuberculose concerne les nœuds lymphatiques bronchiques, trachéobronchiques, rétropharyngiens et médiastinaux. De plus, les poumons, le foie, la rate sont également souvent atteints (Whipple *et al.*, 1996 ; Cassidy *et al.*, 1999 ; Araújo *et al.*, 2005). Cependant, même si la lésion observée semble caractéristique, elle reste une suspicion et il est nécessaire de la valider par des tests de laboratoire complémentaires (OIE, 2008).

##### 2.2. L'histologie

L'examen histopathologique repose sur l'analyse microscopique de coupes de tissus prélevées sur des lésions macroscopiques douteuses. une coloration classique de Ziehl-Neelsen permet de mettre en évidence les lésions caractéristiques de la famille des mycobactéries ; il n'est donc pas spécifique de *M. bovis* et nécessite un isolement bactériologique pour pouvoir affirmer qu'il s'agit de lésions liées à *M. bovis* et conclure à l'infection tuberculeuse (Moyen *et al.*, 2011). C'est une méthode rapide (le résultat est obtenu généralement sous 8 jours) et dont la sensibilité est autour de 93,6 % [89,9 ; 96,9] (intervalle de confiance à 95 % - IC95 %), et la spécificité est moins bonne, autour de 83,3 % [78,7 ; 87,6] (IC95 %) (Courcoul *et al.*, 2014).

##### 2.3. La culture

La culture est la méthode de référence, le « Gold standard », pour diagnostiquer la tuberculose. Réalisée à partir de prélèvements de tissus de bovins abattus ou autopsiés, elle consiste dans un premier temps à l'isolement des mycobactéries (culture sur milieux spécifiques des bactéries

potentiellement présentes dans les lésions tuberculeuses) et à identifier, dans un second temps, la souche bactérienne par le laboratoire national de référence pour la tuberculose bovine situé à l'ANSES Maisons-Alfort. Sa sensibilité a été évaluée à 78,1 % [72,9 ; 82,8] (IC95 %) et sa spécificité à 99,1 % [97,1 ; 100,0] (IC95 %) selon le modèle de Courcoul *et al.*, 2014. Cependant, ce diagnostic est relativement long, il faut en moyenne 4 semaines pour obtenir un résultat positif, et 3 mois pour un résultat négatif (Cardoso *et al.*, 2007). Ces délais sont très préjudiciables aux intérêts économiques des éleveurs, dont les exploitations sont bloquées pendant ce temps (Bénet et Dufour, 2014).

## 2.4. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La technique de PCR (méthode de biologie moléculaire basée sur la mise en évidence du matériel génétique par dénaturation de l'ADN, amplification puis hybridation) permet d'identifier une région génomique des bactéries à partir d'un échantillon biologique. *M. bovis* est recherché à partir de lésions ou de tissus (nœuds lymphatiques par exemple) en absence de lésions visibles macroscopiquement, et la PCR détecte la présence de la séquence d'insertion *IS6110* ou *IS1081* commune à l'ensemble du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. La sensibilité et la spécificité varient selon que l'on travaille sur l'ADN ou l'ARN, selon les amorces choisies et selon la quantité de matériel génétique présent dans l'échantillon. La sensibilité moyenne du test est de 87,7% [82,5 ; 92,3] (IC95 %) et sa spécificité, excellente, de 97,0 % [94,3 ; 99,0] (IC95 %) (Courcoul *et al.*, 2014). La PCR donne un résultat en quelques jours ou deux jours ou une huitaine de jours, ce qui raccourcit le délai du diagnostic de façon à le rendre compatible avec les attentes des acteurs de terrain (Bénet et Dufour, 2014).

## 2.5. Le typage génétique

Il existe différentes méthodes de caractérisation des souches de *Mycobacterium bovis*, basées sur l'identification de polymorphismes au sein de régions spécifiques du génome. La méthode la plus utilisée est le « spoligotypage ». Il s'agit d'une technique d'hybridation qui assure, en une seule étape, l'identification des bacilles tuberculeux et le typage génomique. Elle est fondée sur la caractérisation de la région DR spécifique du génome des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*. (Haddad *et al.*, 2001 ; Dufour *et al.*, 2011). Cette méthode a donc un intérêt épidémiologique puisqu'elle permet de mettre en évidence des profils d'origine, de transmission et de propagation des souches (OIE, 2008). Les spoligotypes isolés en Dordogne sont principalement de type BCG like (Fediaevsky *et al.*, 2010 ; Bénet *et al.*, 2011). Un résultat d'identification et de génotypage à partir d'ADN est obtenu entre 3 et 7 jours en moyenne (Durr *et al.*, 2000a, 2000b ; Allix *et al.*, 2006 ; Walravens *et al.*, 2006 ; McLernon *et al.*, 2010 ; Collins, 2011 ; Hauer *et al.*, 2014).

## 3. Les tests ante-mortem :

### 3.1. Le diagnostic clinique

Du fait de la fréquence des infections inapparentes, de la non-spécificité des symptômes et de la faible prévalence de la tuberculose dans nos régions, Néanmoins, dans les zones à risque et/ou en présence de groupes ayant déjà été touchés par la tuberculose, toute dégradation de l'état général ou chute de production associée à un amaigrissement et une hyperthermie doit amener à suspecter la présence de tuberculose (Gourreau *et al.*, 2012).

### 3.2. L'intradermotuberculation

L'intradermotuberculation (IDT) peut être simple (IDS) ou comparative (IDC). Ces méthodes, qui ont pour but de détecter une hypersensibilité retardée, ont été améliorées (volume de tuberculine, qualité de la tuberculine, lieu d'injection) depuis le début de la prophylaxie et obéissent aujourd'hui à un protocole strict. Ce test est celui recommandé par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) pour le commerce international (Benet *et al.*, 2006 ; Schiller *et al.*, 2010). Ces méthodes simples à réaliser sont également peu coûteuses. Cependant, elles nécessitent une très bonne contention des animaux pour permettre une mesure optimale des plis de peau (mesure effectuée à l'aide d'un cutimètre à ressort) et deux visites du vétérinaire. De plus, en cas de résultat positif ou douteux, une deuxième tuberculation est nécessaire pour confirmer ou infirmer le statut suspect des élevages concernés. Dans ce cas, les deux IDT doivent être espacées d'au moins 6 semaines pour éviter une éventuelle désensibilisation du système immunitaire (SI).

Enfin, les bovins infectés peuvent ne pas répondre aux tests cutanés allergiques, lorsque la maladie est au début de son évolution, lors de phases d'immunodépression (*peri-partum* par exemple) ou en fin d'évolution de la maladie.

- **L'IDS** : Il s'agit d'un test de première intention. On réalise à J0 une injection intradermique d'une dose unique de tuberculine bovine extraite à partir de culture de *M. bovis* au niveau de l'encolure du bovin, puis on évalue à J3 (72 heures) la réaction obtenue au point d'inoculation (**annexe VII**). En France, pour une dose de tuberculine bovine de 0,1 mL de PPD (dérivés protéiniques purifiées), ce titre est fixé (en unités internationales de tuberculine) à 25 000 UI/mL (Delafosse *et al.*, 2002 ; de la Rua-Domenech, 2006 ; Schiller *et al.*, 2010). La sensibilité individuelle moyenne de l'IDS est de l'ordre de 85 %, mais la sensibilité à l'échelle du troupeau peut atteindre 100 %. En effet, il suffit d'un seul animal positif pour que le cheptel infecté soit détecté. La spécificité individuelle est de l'ordre de 98 à 99 %, voire 99,9 % mais elle diminue à l'échelle du troupeau (Bénet J. J., 2010), car il faut que *tous* les animaux testés donnent un résultat négatif pour que le résultat du troupeau soit négatif.

- **L'IDC** : La réalisation de l'IDC nécessite l'utilisation de deux tuberculines différentes : la tuberculine aviaire extraite à partir de *M. avium* et la tuberculine extraite à partir de *M. bovis*. En deux sites espacés de 10 à 15 cm, les deux tuberculines sont injectées au niveau de l'encolure du bovin, l'une au niveau crânial (*M. avium*) et l'autre au niveau caudal (*M. bovis*). La lecture se réalise à J3 (J0 correspondant au jour de l'injection des tuberculines) et consiste à comparer la réaction de l'animal lors de l'injection de tuberculine bovine dans le derme de l'encolure, à la réaction provoquée par l'injection de tuberculine aviaire pratiquée simultanément (**annexe VIII**). La tuberculine aviaire PPD est à un titre de 25 000 UI/mL (Bénet et Praud, 2015). Mais contrairement à l'IDS, l'interprétation du résultat se fait à l'échelle du troupeau soumis à IDC et non à l'échelle individuelle. L'intérêt de l'utilisation de la tuberculine aviaire réside dans le fait qu'il existe une plus grande parenté entre *M. avium* et *M. avium* sub sp. *paratuberculosis*, ou d'autres mycobactéries atypiques, qu'avec le bacille tuberculeux *M. bovis*. Par conséquent, les mycobactérioses atypiques s'exprimeront de manière plus intense lors de l'épreuve par la tuberculine aviaire (Delafosse *et al.*, 2002 ; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Schiller *et al.*, 2010). La sensibilité de l'IDC est plus faible que celle de l'IDS, elle varie de 50 à 64 %. En revanche, sa spécificité est meilleure, de l'ordre de 98 à 99,6 %. C'est une méthode plus coûteuse et plus longue à réaliser que l'IDS. L'IDC est un test de troupeau et il est préférable de la réaliser sur un nombre suffisant d'animaux pour en faciliter l'interprétation.

### 3.3. Le dosage de l'interféron gamma (IFN)

L'IFN est une interleukine impliquée dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Lors d'infection bactérienne à *M. bovis*, les interférons gamma sont synthétisés par les cellules du système immunitaire (SI) (Robinson *et al.*, 2012 ; McGill *et al.*, 2014). Le test de dosage de l'IFN est un test sanguin permettant d'évaluer *in vitro* la réactivité des lymphocytes T circulants stimulés par un antigène tuberculeux. Une à cinq semaines post-infection sont nécessaires pour que l'IFN $\gamma$  relargué par les lymphocytes T soit en quantité suffisante pour permettre son dosage (De la Rua Domenech *et al.*, 2006). Dans un premier temps, comme le montre l'**annexe VIII**, le sang total (recueilli sur tube hépariné) est réparti en trois échantillons mis en incubation pendant 18 à 24 heures avec des antigènes de *M. bovis* ou des antigènes de *M. avium* (pour effectuer une stimulation comparée), ou aucun antigène (témoin négatif). Puis dans un second temps, la mesure de la quantité d'IFN libérée dans le plasma (l'IFN est libéré par les lymphocytes T déjà sensibilisés à la tuberculose lorsqu'ils sont à nouveau en présence d'un antigène tuberculeux) est réalisée par une méthode immuno-enzymatique dite ELISA en « sandwich » utilisant des anticorps monoclonaux anti-IFN $\gamma$  (Rothel *et al.*, 1990 ; Wood *et al.*, 1990a, 1990b ; Wood et Jones, 2001)

Le test conventionnel (Bovigam®) utilise les PPD aviaire et bovine et donne un résultat positif si la quantité d'IFN libérée par les lymphocytes T après culture en présence de PPD bovine est supérieure à celle obtenue avec les PPD aviaire. La présence de nombreux antigènes communs avec *M. avium* ou les bactéries saprophytes a fait qu'on a reproché à ce test sa spécificité médiocre, et des recherches ont été effectuées pour trouver des antigènes plus spécifiques à *M. bovis*. C'est dans cette optique que l'utilisation d'autres antigènes a été développée, les antigènes ESAT6 (*early secreted antigenic target*, protéine de 6 kDa majeure au début de l'infection) et CFP10 (*culture filtrate protein*, protéine de 10 kDa), qui appartiennent au complexe *Mycobacterium tuberculosis* et permettent de s'affranchir des erreurs liées aux mycobactéries environnementales. Ces antigènes sont utilisés sous forme de protéines recombinantes qui possèdent de nombreux épitopes, ce qui les rend très immunogènes. En effet, plusieurs études ont montré que l'utilisation d'un recombinant permet une augmentation de la spécificité ; par exemple, l'utilisation d'ESAT6 donne au test une spécificité de 99,2% contre 92,2% avec les PPD (Pollock *et al.*, 2000). Le bon déroulement de la technique ELISA est contrôlé par l'emploi d'un témoin positif (TP) d'immunocompétence cellulaire noté PWM (de l'Anglais *poke weed mitogen*) et d'un témoin

négatif (TN) de stimulation cellulaire, qui utilise le tampon phosphate salin (abrégié PBS, de l'Anglais *phosphate buffered saline*) (Annexe VIII) ; les critères auxquels doivent répondre les densités optiques (DO) des différents témoins pour qu'une interprétation du test soit possible sont présentés dans le **tableau 02** ci-après. Une fois ces conditions sont vérifiées, alors il est possible de procéder au calcul de différents ratios puis, par combinaison, à l'interprétation du résultat final du test IFN (résultat positif, négatif ou non conclusif) selon les seuils de positivité et les grilles d'interprétation détaillés dans la partie "matériel et méthodes".

**Tableau 02** : Critères de validation de la qualité de l'échantillon et de la technique ELISA permettant une interprétation ultérieure du test

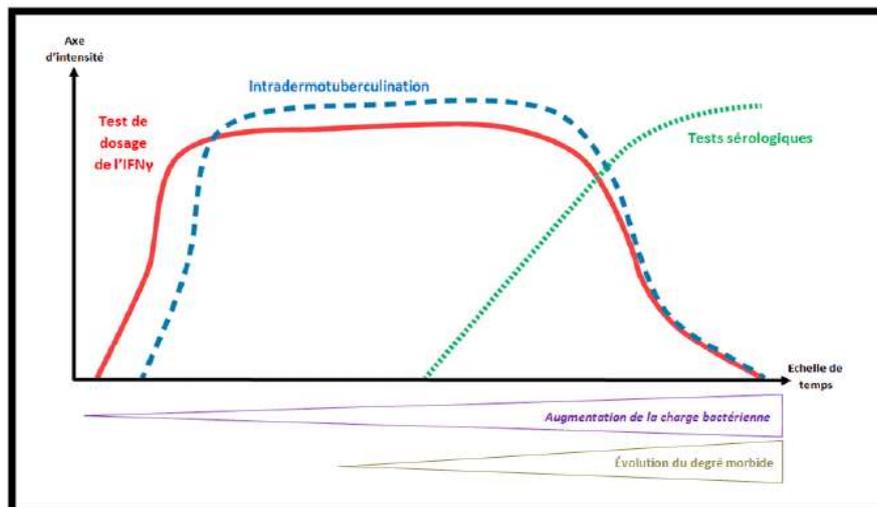
	Critères fixés par le laboratoire national de référence
Validation de la qualité de l'échantillon	Ratio PBS = $DOPBS / [3 \times (DOTP - DOTN)] < 0,125$ Ratio PWM = $(DOPWM - DOPBS) / [3 \times (DOTP - DOTN)] > 0,2$
Validation de l'analyse ELISA par les témoins	DOTN < 0,130 et écart entre DOTN < 0,040 DOTP > 0,55 et écart entre DOTP < 0,3

Légende : DOTN ou DOTP représentent les moyennes des trois densités optiques des témoins négatifs et positifs respectivement.

Calculs des ratios : La norme NF U47-019 relative aux méthodes d'analyses en santé animale lors de la mise en œuvre des techniques ELISA recommande d'intégrer aux critères d'interprétation les absorbances des témoins, de manière à lisser les variations d'absorbance dues aux conditions l'analyse. C'est pourquoi, les critères d'interprétation prévus par le laboratoire national de référence (LNR) se basent sur des ratios intégrant les variations d'absorbance des TP et TN. Ceci permet d'obtenir des résultats plus aisément comparables d'un laboratoire à un autre. Afin d'interpréter les résultats du test, trois ratios sont préalablement calculés à partir des densités optiques obtenues par stimulation avec les PPD (PPDB et PPDA) et les antigènes recombinants (noté MIX) :

- Ratio PPD =  $(DO\ PPDB - DO\ PPDA) / [3 \times (DO\ TP - DO\ TN)]$
- Ratio PPDB =  $(DO\ PPDB - DO\ PBS) / [3 \times (DO\ TP - DO\ TN)]$
- Ratio MIX =  $(DO\ MIX-EC - DO\ PBS) / [3 \times (DO\ TP - DO\ TN)]$

L'un des avantages principaux de cette technique est qu'elle ne nécessite qu'un seul déplacement dans l'élevage et donc une seule contention des animaux. De plus, ce test fournit des résultats objectifs indépendants de l'interprétation faite par l'intervenant. En outre, le dosage de l'IFN permet de révéler des animaux infectés non-détectés par l'IDT. L'explication la plus probable de ce phénomène est que le test IFN détecte les bovins à un stade plus précoce d'infection que ne le peut l'IDT, soit dès le 14<sup>ème</sup> jour après l'infection, comme cela est illustré dans la **figure 01** ci-après (Buddle *et al.*, 1995). De plus, en 2005, Dean *et al.*, soulignent que le délai entre l'infection et la détection par test IFN $\gamma$  est indépendant de la dose infectante de *M. bovis*. Ceci montre la capacité du test à détecter des bovins infectés avec des doses minimales de *M. bovis* et donc peu après l'infection.



**Figure 01** : Présentation graphique du spectre de réponse immunitaire aux tests de dosage de l'IFN $\gamma$  et d'IDT (RIMC) ainsi qu'aux tests sérologiques (RIMH) des bovins infectés par *M. bovis* en fonction du temps et du spectre pathologique (d'après de la Rua-Domenech *et al.*, 2006)

La sensibilité de ce test est bonne et supérieure à celle de l'IDS. D'après la littérature, la sensibilité du test IFN varie entre 73,0 % et 100 %, avec une valeur médiane de 87,6 % pour le test Bovigam® (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Concernant la sensibilité du test IFN à l'échelle du troupeau, elle est considérée comme excellente et voisine de 1. La limite majeure de cette technique est imputable à une spécificité moyenne, nettement inférieure à celle de l'IDS. L'utilisation du polypeptide ESAT-6 ou de la protéine CFP-10 pour la stimulation des lymphocytes peut toutefois améliorer la spécificité du test (Bezous *et al.*, 2014).

À l'instar de l'IDT, le test de dosage de l'IFN ne permet pas de détecter les bovins en phase d'anergie ou lorsque le système immunitaire à médiation cellulaire est déprimé (Hope *et al.*, 2005 ; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). En effet, lors de l'étape de stimulation cellulaire, aucun témoin positif ne permet de confirmer que la synthèse d'IFN par des LT sensibilisés est effective. Or, ceci semble être un élément important pour l'interprétation des résultats, notamment si les animaux sont soumis à un stress qui entrainerait l'inactivation des LT sensibilisés chez des animaux infectés. D'autre part, chez les jeunes bovins, l'utilisation du test de dosage de l'IFN aboutit souvent à des résultats faussement positifs, du fait de réaction non-spécifique de synthèse d'IFN par les NK (Olsen *et al.*, 2005).

#### **IV. Utilisation du dosage de l'IFN en France**

Elle a été développée en Australie à la fin des années 1980 et est pratiquée en France depuis 2009, année où elle a été introduite à titre expérimental en Côte d'Or et en Dordogne pour aider à la gestion des résultats douteux obtenus en intradermotuberculination, en dehors de la réglementation européenne (Directive CE 64/432) qui n'autorise que l'utilisation en parallèle du test IFN. Les contextes d'utilisation du test IFN sont les suivants :

- L'utilisation du test de dosage de l'IFN et d'une intradermotuberculination associés en « parallèle » consiste à effectuer la prise de sang pour le dosage d'IFN et la tuberculination le même jour. Elle permet d'augmenter la sensibilité du dispositif de dépistage. En France, ce protocole est utilisé dans le cadre des mesures de police sanitaire d'abattage partiel et d'assainissement du troupeau afin d'identifier et d'éliminer les animaux infectés au sein d'un foyer de tuberculose.
- L'utilisation « en série » du test de dosage de l'IFN après l'obtention d'une réaction non négative à l'intradermotuberculination permet d'augmenter la spécificité du dispositif de dépistage. Cette méthode n'est pas autorisée par la réglementation européenne. Elle a été utilisée à titre dérogatoire entre 2009 et 2012 afin de raccourcir le temps de blocage des exploitations suspectes (en Côte d'Or et Dordogne) et à l'échelle nationale dans le cadre du protocole expérimental mis en œuvre entre 2013 et 2015, afin d'étudier les caractéristiques de ce type d'association.
- L'utilisation en première intention est mise en œuvre dans certaines zones géographiques dans lesquelles la contention des bovins rend la réalisation des intradermotuberculinations difficile voire impossible (races de combat en Camargue).

#### **V. Effet d'une injection de tuberculine sur le résultat d'IFN**

Cependant, l'effet d'une intradermotuberculination récente sur le résultat au test de dosage de l'IFN a été largement étudié dans le but de savoir s'il pouvait y avoir une conséquence sur le dépistage des animaux testés. La bibliographie est contradictoire à ce sujet : dans les études portant sur des animaux infectés dans les conditions naturelles, il a été montré que l'IDC n'affecte pas la réponse au test à l'IFN, qui peut être mené dès le troisième jour après l'intradermotuberculination (Gormley *et al.*, 2004). A l'opposé, les publications traitant d'études expérimentales rapportent une modification de la réponse en IFN (augmentation ou diminution) suite à l'intradermotuberculination, et déconseillent la réalisation du test dans les sept jours suivant l'intradermotuberculination (Schiller *et al.*, 2010).

En effet, il est rapporté dans la littérature que 3 jours après l'injection simple de tuberculine bovine, la réponse IFN au test est stimulée chez les bovins infectés (Rothel *et al.*, 1992 ; Schiller *et al.*, 2010). D'autre part, les densités optiques augmentent progressivement après l'injection de tuberculine à un animal infecté à partir de trois jours jusqu'à 7, 28 ou 59 jours post-injection suivant les études (Rothel *et al.*, 1992 ; Palmer *et al.*, 2006). Ceci est conforme aux conclusions d'autres auteurs : aux États-Unis en 2001, Whipple et ses collaborateurs ont mis en évidence que la réalisation d'une IDS au pli sous caudal stimulait bien la réponse IFN à partir de trois jours post-injection et jusqu'à 63 jours. De plus,

cette équipe a découvert que, 3 jours après l'injection de tuberculine, les densités optiques des échantillons prélevés et stockés pendant une nuit étaient plus élevées que les densités optiques obtenues sur les échantillons testés 2 heures après la prise de sang. Ces données furent par la suite confirmées par Gormley et son équipe en 2004 (Whipple *et al.*, 2001 ; Gormley *et al.*, 2004 ; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). En définitive, la réalisation d'une IDS préalablement à la prise de sang peut augmenter la réponse IFN chez les bovins infectés. Cet effet n'a toutefois jamais été mis en évidence chez des individus sains.

L'effet de l'utilisation de l'IDC sur la réponse IFN ne fait pas l'unanimité. La capacité de synthèse d'IFN par les LT effecteurs après stimulation et incubation ne semble pas affectée par la réalisation préalable d'une IDC (Doherty *et al.*, 1995 ; Gormley *et al.*, 2004 ; Coad *et al.*, 2007). Toutefois, les études publiées sur l'utilisation d'une IDC préalablement à l'usage du test IFN sont parfois contradictoires. Certains auteurs ont démontré que, chez des bovins expérimentalement infectés, les valeurs de DO obtenues au test IFN sont plus faibles si une IDC a précédé le dosage IFN. Toutefois, ils constatent que cela n'affecte pas l'interprétation du test Bovigam®, l'issue et l'interprétation du test demeurent les mêmes. Ce n'est pourtant pas le cas si le test IFN est effectué avec des antigènes immuno-dominants sans recours aux PPDs : il y a alors une réduction du taux de détection des bovins infectés (Whelan *et al.*, 2004). D'autre part, la littérature rapporte que l'utilisation de l'IDC peut diminuer la sensibilité du test IFN $\gamma$  s'il est réalisé entre 7 et 21 jours après l'injection de tuberculine (Marassi *et al.*, 2010). Par ailleurs, certains auteurs ont observé que chez des veaux expérimentalement infectés, l'effet « booster » de la réponse IFN n'était effectif qu'avec l'incubation en présence de PPDA. De fait, la stimulation sélective de la réponse IFN aux PPDA peut altérer le diagnostic de l'infection par le test IFN. C'est pourquoi certains auteurs suggèrent qu'il est plus prudent de ne pas réaliser le test Bovigam® dans les 7 jours après une IDC (Thom *et al.*, 2004 ; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). En définitive, bien que l'IDC ne semble pas impacter de manière significative la réponse IFN chez les animaux naturellement infectés (Gormley *et al.*, 2006 ; Coad *et al.*, 2007), les résultats contradictoires présents dans la littérature imposent de rester vigilant qu'en aux réelles conséquences de l'IDC sur la réponse IFN lors d'utilisation en série des tests (Wood et Jones, 2001 ; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Gormley *et al.*, 2006). En effet, il semble paradoxal que l'IDS, soit l'injection de tuberculine bovine impacte la réponse au test IFN, mais que cette même injection, réalisée dans le cadre de l'IDC, se trouve sans effet notable sur les résultats aux tests IFN.

Pour le moment, aucun consensus n'a été établi quant à l'effet de l'IDC sur le test de dosage de l'IFN. D'autres paramètres tels que le temps de stockage entre la collecte des prélèvements et la réalisation du test ainsi que la température de stockage ou d'incubation ont été étudiés, comme l'illustre **l'annexe X**. Le stockage d'un prélèvement sanguin durant 24 heures avant la réalisation du test au laboratoire semble diminuer la réponse au test IFN (densités optiques moyennes plus faibles) sans toutefois entraîner de modification majeure sur l'issue du test, c'est-à-dire sur l'interprétation finale positif *versus* négatif (Vordermeier *et al.*, 2004 ; Whelan *et al.*, 2004). Principalement deux études s'attachent à étudier les facteurs de risque expliquant les réponses faussement positives au test IFN. Différents facteurs d'influence tels que le type de production, les caractéristiques d'élevage, ou l'état physiologique de l'animal ont pu être identifiés. Toutefois, les auteurs soulignent que la significativité des facteurs de risques étudiés est très dépendante du contexte d'étude : plus particulièrement, dans certaines régions on observe plus fréquemment des réactions non-spécifiques ou croisées dues à des mycobactéries environnementales ou à *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Cagiola *et al.*, 2004a ; Gormley *et al.*, 2013). Aussi est-il établi que beaucoup de facteurs peuvent influencer la réponse au test IFN et la qualité de cette technique de dépistage dépend des conditions épidémiologiques locales.

## **Deuxième partie : contribution personnelle**

## I. Contexte de mise en place du protocole expérimental

Dans le cadre du dépistage systématique de la tuberculose bovine en élevage et afin de pouvoir étudier la possibilité de remplacer l'IDC réalisée 42 jours suite à l'obtention d'un résultat non négatif à l'IDS par un dosage d'interféron gamma (IFN) juste après la lecture de l'IDS, le protocole expérimental national IFN a été mis en place. L'objectif principal de ce protocole était d'étudier si ce dosage de l'IFN pratiqué le jour de la lecture des résultats de l'IDS (J3) est au moins aussi sensible que l'IDC de reconrôle à J42 recommandée par la réglementation européenne (Directive CE 64/432). Ce protocole visait aussi à déterminer si l'injection de tuberculine réalisée à J0 influe ou non sur le résultat du test IFN réalisé à J3, ce qui constitue l'objectif majeur de notre travail de stage.

Des expérimentations préliminaires menées sur l'IFN dans deux départements (Côte-d'Or, Dordogne) entre 2008 et 2011 n'ont pas permis de répondre à ces question car les contextes d'utilisation des tests étaient particuliers, les schémas diagnostiques variaient d'un département à l'autre et les protocoles de réalisation du test de dosage de l'IFN étaient variables selon le laboratoire concerné. De plus, le faible nombre d'animaux constituant l'échantillon engendrait un manque de puissance statistique. Les informations disponibles dans la littérature ne permettent pas de statuer sur l'existence d'un effet de l'injection de tuberculine sur le résultat de l'IFN (*cf. supra* : Partie Etude bibliographique)

Ce nouveau protocole a été mis en œuvre par la DGAI, en partenariat avec l'ANSES et était suivi par la plateforme nationale d'épidémiologie en santé animale (Plateforme ESA) qui a assuré la mise en œuvre de l'expérimentation et la collecte des résultats. L'unité EpiMAI (Epidémiologie des Maladies Animales Infectieuses) de l'ENVA (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort) était chargée de l'analyse des données. Le principe du protocole a été testé lors de la campagne de prophylaxie 2012/2013 dans certains élevages afin de vérifier sa faisabilité. L'expérimentation à proprement parler a été conduite sur deux campagnes de prophylaxie (2013-2014 et 2014-2015).

## II. Matériel et méthodes

### 1. Echantillon étudié

#### Période d'étude

Le protocole expérimental s'est étendu sur une durée de deux campagnes de prophylaxie consécutives de 2013 à 2015, pour permettre de collecter suffisamment de données afin de disposer d'une puissance statistique adéquate (en particulier concernant les animaux infectés).

#### Zone d'étude

L'étude a été menée sur l'ensemble du territoire national continental pour les animaux répondant aux critères d'inclusion. Dix départements ont pu être inclus dans le dispositif à savoir les Ardennes (08), l'Ariège (09), la Charente (16), la Côte-d'Or (21), la Dordogne (24), le Lot-et-Garonne (47), les Pyrénées-Atlantiques (64), les Hautes-Pyrénées (65), le Tarn (81) et la Haute Vienne (87).

#### Critères d'inclusion et d'exclusion des animaux dans le protocole

Pouvaient être inclus dans le protocole tous les troupeaux bovins de France continentale ayant fourni des résultats non négatifs à l'intradermotuberculination. Il fallait tout d'abord s'assurer que l'éleveur ainsi que le vétérinaire sanitaire acceptaient de s'engager à suivre le protocole selon les conditions prévues dans la note de service DGAL/SDSPA/2014-864 du 28 octobre 2014 et notamment une lecture précise systématique des plis de peau à l'aide d'un cutimètre. Le formulaire d'engagement figure en **annexe XI**. Dans les départements fortement impactés par la TB, il était laissé à l'appréciation du préfet la possibilité d'imposer le protocole à tous les élevages ayant obtenu des résultats non négatifs à l'intradermotuberculination. Ce fut le cas pour les départements de Côte-d'Or et de Dordogne aux cours des deux campagnes prophylactiques étudiées. De plus, les vétérinaires sanitaires devaient suivre une formation relative à la tuberculination à la demande de la DDPP. En cas d'abandon ou de non-respect du protocole, la DDPP était en droit de retirer la qualification de l'élevage. L'inclusion dans le protocole permettait cependant pour les élevages de bénéficier de mesures de gestion particulière (à

titre d'exemple, en cas de suspicion faible, le blocage de l'élevage était limité aux seuls animaux réagissant).

Ont été exclus du protocole tous les troupeaux où la contention des bovins n'était pas optimale pour une lecture adéquate des tuberculinations (taureaux de combat par exemple), les troupeaux classés à risque administratif, les élevages dont le vétérinaire sanitaire refusait de suivre la formation relative à la tuberculination ou de se soumettre à des mesures de supervision de la part de la DDecPP et enfin les établissements de quarantaine et de collecte de semence pour les inséminations artificielles.

### Cas particulier des élevages en suivi renforcé (SR)

Dans les bases de données brutes (2013-2014 et 2014-2015) reçues pour les analyses, certains enregistrements en provenance de Dordogne concernaient des animaux provenant d'élevages en « suivi renforcé » (SR), c'est-à-dire dont le contexte épidémiologique était à risque par rapport à la tuberculose bovine. Les animaux en SR ne respectaient pas forcément le premier critère d'inclusion à savoir l'obtention de résultats non-négatifs à l'IDT initiale. En effet, ces bovins en SR ont été soumis aux tests de façon systématique, quel que soit leur résultat à la première IDT de dépistage. Une caractéristique essentielle de ces animaux en SR était le fait que la prise de sang pour le premier test IFN était faite le même jour que l'IDT (et non cinq à huit jours plus tard, ce qui était le cas pour les animaux inclus dans le protocole), ce qui suggère que les résultats du premier IFN des animaux en SR n'étaient pas modifiés par la tuberculination.

## 2. Description du protocole

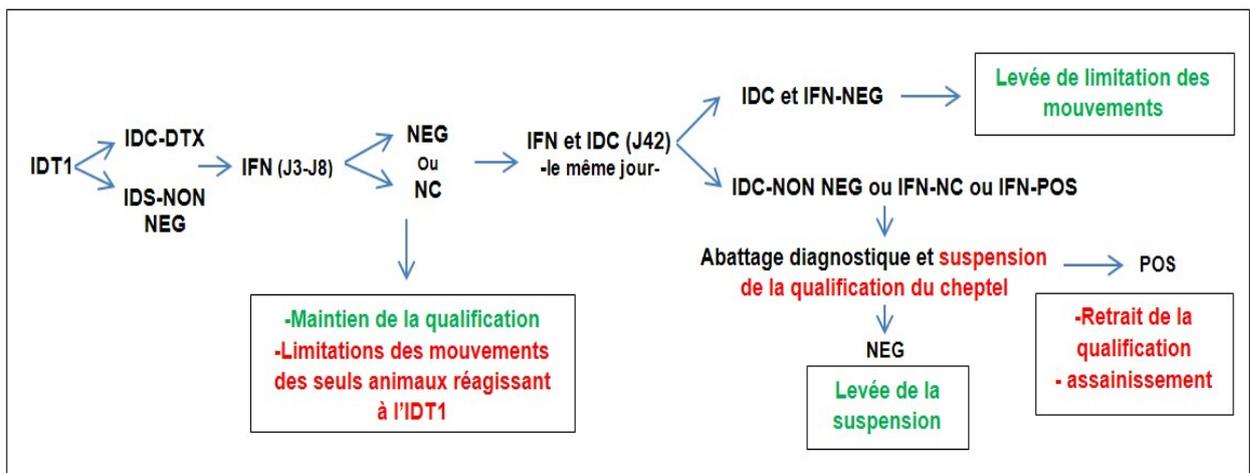
Les troupeaux ont été inclus dans le protocole suite à l'observation de résultats non négatifs à une ou plusieurs intradermotuberculinations réalisées dans le cadre de la prophylaxie en élevage (IDS ou IDC selon le département, réalisée à J0). Les animaux réagissant à J3 ont subi une prise de sang pour réalisation du test de dosage de l'interféron effectué entre J3 et J8.

*(Rappel : pour les animaux en SR, la prise de sang était pratiquée le même jour de l'IDT.)*

On retient ensuite deux cas :

### Suspicion faible

Un troupeau était en « suspicion faible » s'il avait obtenu un résultat non négatif (i.e. positif ou douteux) à l'IDS OU une IDC douteuse et un résultat à l'IFN non conclusif ou négatif (**Figure 02**). Dans ce cas, la qualification de l'élevage était maintenue et les animaux qui n'avaient pas réagi aux intradermotuberculinations n'étaient pas bloqués dans l'élevage et pouvaient circuler sur le territoire français. Les autres bovins, réagissant à l'IDS ou l'IDC, devaient cependant faire l'objet d'une limitation de mouvement jusqu'à un recontrôle à 42 jours par IDC et IFN. À 42 jours, si l'on obtenait un résultat non négatif à l'IDC ou à l'IFN, l'élevage était placé sous APMS et on effectuait un abattage diagnostique.



DTX : Douteux ; NC : Non conclusif ; POS : Positif ; NEG : Négatif ; NON-NEG : Non-négatif

**Figure 02** : Schéma décisionnel dans le cadre du protocole expérimental en cas de suspicion faible due à l'obtention d'une IDC ou IDS initiale douteuse et un résultat à l'IFN non conclusif

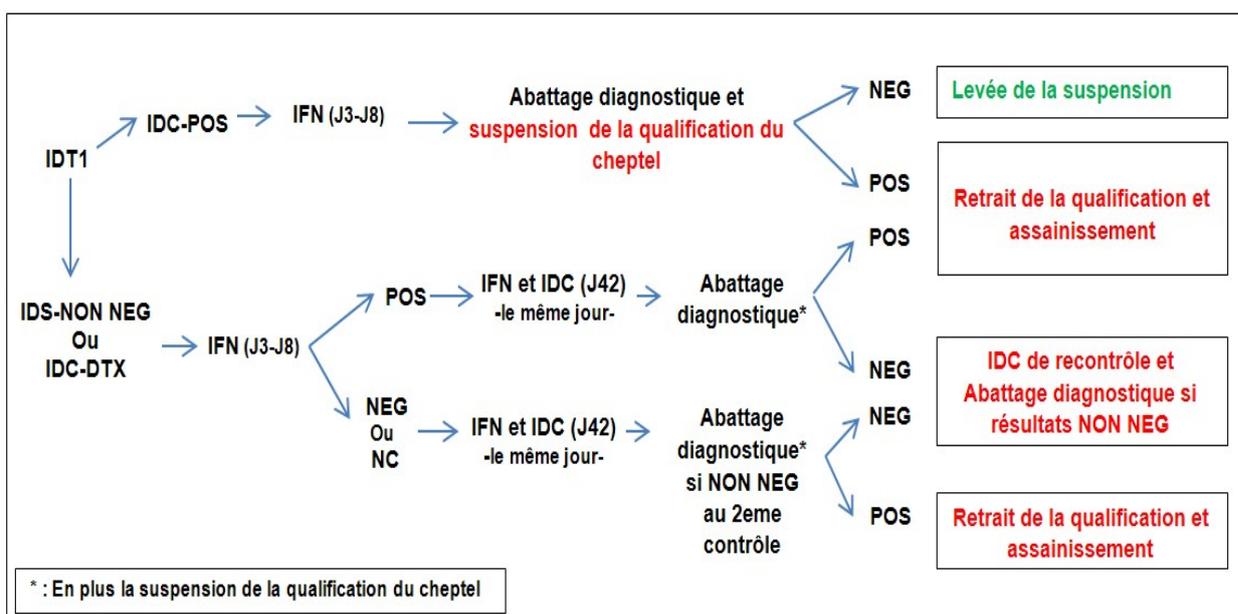
### Suspicion forte

Un troupeau était en suspicion forte dans les cas suivants :

- Le résultat à l'IDC était positif : les bovins à IDC positive étaient fortement suspects et étaient soumis à un abattage diagnostique immédiatement après la réalisation du test IFN à J3, afin de confirmer l'infection éventuelle du cheptel. Les autres animaux pouvaient être inclus dans le protocole.
- Le résultat à l'IDS était non négatif OU le résultat à l'IDC était douteux ET le résultat du dosage d'interféron était positif.

Dans ce second cas, comme la montre la **figure 03** ci-dessous, la qualification du troupeau était suspendue et les bovins étaient recontrôlés 42 jours plus tard par IDC et IFN (à J42, la prise de sang était effectuée le même jour que la tuberculination).

En dehors des résultats des IDC ou IDS, les animaux ayant présenté une réaction positive à l'IFN faisaient l'objet d'un abattage diagnostique.



DTX : Douteux ; NC : Non conclusif ; POS : Positif ; NEG : Négatif ; NON NEG : Non-négatif

**Figure 03** : Schéma décisionnel dans le cadre du protocole expérimental en cas de suspicion forte due à l'obtention d'une IDC initiale positive ET à l'obtention d'une IDS initiale non négative ou une IDC douteuse.

Dans tous les cas, le protocole légal recommandé par la Commission Européenne (conforme à l'AM du 15/09/2003 modifié et à la Directive CE/64/432) était respecté, et l'on effectuait des prises de sang supplémentaires pour les recherches concernant l'IFN dans le cadre du protocole expérimental.

### **3. Modalités de réalisation des tests de dépistage et de diagnostic**

#### **Réalisation des tests cutanés**

A J0 comme à J42, un compte-rendu de résultats était complété par le vétérinaire avant d'être envoyé à la DDecPP.

A J0 : Les tests d'intradermotuberculination (IDS ou IDC selon les départements) étaient réalisés selon les conditions stipulées par la note de service n° 2012-8237 (notamment la nécessité d'effectuer la mesure de pli de peau à l'aide d'un cutimètre a cadran)

A J42 : Le second test d'IDT devait être obligatoirement une IDC. Elle était effectuée le même jour que la prise de sang pour le dosage de l'IFN $\gamma$ , au minimum à 42 jours et au maximum à 52 jours après la première IDT. (Aucun traitement immunodépresseur ne devait être administré aux animaux entre la première l'IDT à J0 et le recontrôle à J42).

## Réalisation du test de dosage IFN

A J3-J8 : Les prises de sang étaient pratiquées dans les cinq jours qui suivaient la lecture d'un résultat non-négatif en intradermotuberculation donc entre J3 et J8 (J0 étant le jour de la première IDT).

La collecte des prélèvements (10 mL de sang dans un tube hépariné, les tubes étant acheminés dans les 6 à 8 heures au laboratoire à une température ambiante comprise entre 17 et 23 °C) était gérée localement, de manière directe entre les vétérinaires et le laboratoire d'analyses agréé, le tout coordonné par la DDecPP. Les prélèvements étaient transportés dans une enveloppe scellée ou un sac scellé avec le nom de l'éleveur, la date et l'heure du prélèvement.

Au laboratoire, outre la mise en réaction du prélèvement sanguin avec les solutions témoins, la stimulation était effectuée à l'aide de deux antigènes différents :

- Des tuberculines aviaire (PPDA) et bovine (PPDB) commercialisées par Prionics® sous la dénomination Bovigam® ;
- Des antigènes spécifiques recombinants ESAT-6 et CFP-10 commercialisés par Prionics® sous la dénomination « Peptide Cocktail- ESAT-6 CFP-10 », noté MIX-EC par la suite.

A J42 : Les prises de sang étaient pratiquées le même jour que l'IDC (au minimum 42 jours et au maximum 52 jours après la réalisation de la première intradermotuberculation). Le traitement des échantillons par le laboratoire était identique au mode opératoire décrit précédemment.

Le réseau de laboratoires agréés a été étendu pour effectuer la stimulation des lymphocytes dans les heures suivant le prélèvement sanguin dans un laboratoire de proximité ainsi que pour effectuer les analyses ELISA sandwich pour le dosage de l'interféron gamma. Ainsi, les conditions de réalisation et d'interprétation des tests ont été standardisées par le Laboratoire National de Référence, pour l'ensemble des laboratoires du réseau. Les critères d'interprétation des résultats des tests IFN (critères pour être interprétables) sont détaillés dans l'**annexe XII**.

La fixation du seuil de positivité d'un test est un enjeu de taille. En effet, le couple sensibilité/spécificité varie en fonction de la valeur choisie pour le seuil de positivité. Par conséquent, avoir une bonne spécificité implique une dégradation de la sensibilité et *vice versa*. La fixation des seuils de positivité permet également de restreindre les effectifs d'animaux fournissant un résultat « non-conclusif » (NC) au test IFN.

L'analyse des données de la campagne 2013-2014 a conduit à revoir les seuils de positivité pour la campagne suivante (ce sont ces nouveaux seuils qui ont été utilisés dans le cadre de notre étude) dans le but d'affiner la spécificité du protocole expérimental sans en détériorer la sensibilité. Comme indiqué dans le **tableau 03** ci-après, le seuil du ratio MIX-EC a donc été réévalué passant de 0,015 à 0,03, ainsi que celui du ratio PPDB passant de 0,4 à 0,7.

**Tableau 03** : *Seuils de positivité avant et après correction sur la base des résultats de la première campagne du protocole, fournis par le LNR.*

SEUILS	RATIO	Ancien	Actuel (depuis 2014)
	PPD	0.05	0.05
	MIX-EC	0.015	0.03
	PPDB	0.4	0.7

Ainsi, l'interprétation des résultats des tests IFN serait réalisée comme indiqué dans le **tableau 04** ci-après :

**Tableau 04** : Interprétation des résultats des tests IFN selon les nouveaux seuils de positivité fournis par le LNR

		PPD (% DO)		
		PPD < 0,05	0,05 ≤ PPD < 0,3	PPD ≥ 0,3
<b>MIX (% DO)</b>	MIX < 0,03	NEGATIVE	NON CONCLUSIF	POSITIVE
	0,03 ≤ MIX < 0,1	NON CONCLUSIF		
		Si PPD Bovine > 0,7 : POSITIVE		
	MIX ≥ 0,1			

### **Abattage diagnostique et examens *post-mortem***

Tous les bovins entrés dans le protocole et ayant présenté un résultat positif à l'IFN J3 ou à J42 ou un résultat positif à l'IDC à J42 ont été abattus pour diagnostic. D'autre part, les bovins ayant présenté un résultat d'IDC douteux (ou un résultat d'IDS non négatif) et/ou un résultat non conclusif à l'IFN J3 et qui ont obtenu un résultat d'IDC douteux et/ou un résultat non conclusif à l'IFN J42 ont également été abattus. Ces cas sont présentés dans l'arbre décisionnel en **annexe XIII**. Les abattages diagnostiques ont été effectués sous la surveillance des inspecteurs vétérinaires du site d'abattage, qui étaient informés de la demande d'une inspection particulière pour les animaux concernés. Les abattages diagnostiques étaient accompagnés d'une recherche systématique de *M. bovis* par PCR et par culture, sur les prélèvements effectués au niveau des lésions ou, si aucune lésion n'était visible, sur des prélèvements réalisés sur plusieurs paires de nœuds lymphatiques, conformément aux instructions en vigueur.

## **4. Gestion des données et analyses statistiques**

### **Collecte et gestion des données**

Les DDecPP ont enregistré dans le logiciel SIGAL l'inclusion des troupeaux dans le protocole et fourni les données relatives au contexte épidémiologique, à la description de l'animal et du cheptel d'origine, aux résultats d'intradermotuberculation et aux résultats des analyses réalisées sur les prélèvements effectués lors des abattages diagnostiques. Après extraction, la qualité de ces données a été vérifiée et validée par les CIREV avant qu'elles ne soient transmises à l'Unité EpiMAI de l'ENVA pour analyse et interprétation.

Les données disponibles étaient sous forme d'un fichier Microsoft Excel. La base de données a été gérée à l'aide du logiciel Microsoft Access.

### **Analyses statistiques**

Les sensibilités des tests ont été calculées chez les animaux infectés et les spécificités ont été calculées chez les animaux indemnes. Les animaux ont été considérés comme infectés lorsqu'ils avaient obtenu un résultat positif en culture ou en PCR. Les animaux ont été considérés comme indemnes lorsqu'ils provenaient d'un élevage qui avait conservé son statut officiellement indemne à l'issue des campagnes de prophylaxie étudiées.

Les animaux inclus dans le protocole avaient tous obtenu un résultat non négatif à l'IDT réalisée en première intention. En revanche, les animaux provenant d'élevages en suivi renforcé ont été inclus dans la base de données quel que soit leur résultat à la première IDT. Afin de constituer un échantillon homogène d'animaux, nous avons conservé pour les analyses tous les animaux dont le résultat était non négatif à l'IDT1. Les sensibilités et les spécificités calculées sont donc conditionnelles à l'obtention d'un résultat non négatif à l'IDT1.

L'effet de l'intradermotuberculation sur les résultats du dosage d'interféron gamma réalisé dans les 3 à 8 jours suivants a été étudié de deux manières :

Approche dite "qualitative" : dans laquelle on s'est intéressé aux résultats qualitatifs (négatif ou non-négatif) des tests IFN. Dans un premier temps, les résultats à l'IFN global (interprété avec le MIX et le Bovigam) ont été pris en compte. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au test IFN

interprété avec le Bovigam seul. Cette approche permet après avoir étudié la répartition des animaux suivant leurs combinaisons de résultats aux quatre tests (IDT1, IDT2, IFN1 et IFN2), tout d'abord à ne sélectionner que les animaux dont les résultats aux tests cutanés étaient identiques (pour garantir que le statut immunitaire des animaux évolue peu) et ensuite à comparer les pourcentages des animaux réagissant au test IFN1 à celui des animaux réagissant au test IFN2 (test statistique Mc Nemar sur échantillons appariés) de façon à étudier un éventuel effet de la tuberculine injectée à l'occasion de l'IDT1 sur les résultats des tests IFN. Etant donné que la succession des tests n'était pas la même chez les animaux en SR et chez ceux entrés dans le protocole, leurs résultats ont donc été analysés séparément.

Approche dite "quantitative" : dans cette approche, on s'est intéressé à la production de la densité optique. En France, les résultats de dosage de l'interféron gamma sont fournis sous la forme d'une proportion de DO (rapportée aux résultats de DO fournis par les témoins négatif TN et positif TP) et non d'une DO brute. Le raisonnement consiste à utiliser les ratios PPD, calculés à partir des densités optiques selon la formule suivante :  $RATIO\ PPD = (DO\ bov - DO\ aviaire) / (3 \times (DO\ TP - DO\ TN))$ . Il s'agit donc d'un pourcentage de densité optique globale qui prend en compte à la fois la réaction due aux Mycobactéries aviaires et nivelle les variations éventuelles dues aux réactifs fournis dans les kits commercialisés. Ce type d'interprétation constitue une spécificité française. Dans les autres pays européens, l'interprétation du résultat est basée sur la DO brute.

Le principe de cette partie est fondé sur la comparaison, grâce aux tests t de Student et aux tests de Wilcoxon sur séries appariées, des ratios des densités optiques en réponse aux PPDA, PPDB et le MIX suite aux tests d'IFN afin d'étudier les variations de la réponse immunitaire des animaux en suivant l'évolution des résultats d'IFN et des tests cutanés à J3 et à J42. Nous avons décidé de faire l'analyse des résultats séparément chez les animaux inclus dans le cadre de protocole et chez les animaux inclus en SR (type d'inclusion différent).

Les tests statistiques (test de Student, test de Mac Nemar, test de Wilcoxon,  $\chi^2$ ) ont été effectués à l'aide du logiciel R (en ligne via l'interface BiostaTGV ou directement via l'interface Rstudio). Le seuil de significativité a été fixé à 5 % et on le test t de Student ou le test de Wilcoxon a été choisi selon la distribution des effectifs (normale ou non). La normalité de la distribution a été vérifiée grâce au logiciel R.

### III. Résultats

#### 1. Données disponibles

Pour les deux campagnes de prophylaxie étudiées (2013-2014 et 2014-2015), la base de données contenait 18267 lignes de résultats, correspondant à 13222 animaux. Chaque ligne de résultat comportait les données répertoriées dans l'**annexe XIII**. Parmi eux, on comptait 10980 bovins considérés comme indemnes (provenant d'un élevage officiellement indemne et qui avait conservé sa qualification après la réalisation des tests de dépistage) et 117 bovins dont l'infection a été confirmée avec certitude (présentant un résultat positif à la PCR et/ou un résultat positif à la culture).

Un premier tri des données a révélé que pour certains animaux, on ne disposait pas de toutes les informations nécessaires au traitement des données (résultats des tests inconnus, dates de réalisation des tests non renseignées...). Après élimination de ces animaux, restaient 1622 animaux indemnes (1276 inclus dans le cadre du protocole et 346 en suivi renforcé) et 53 animaux infectés (32 inclus dans le cadre du protocole, 20 en suivi renforcé et 1 animal issu de foyers).

Afin de garantir la cohérence des analyses, les animaux pour lesquels les délais entre la réalisation des tests intradermiques et de l'IFN étaient aberrants (à titre d'exemple : délai entre les deux tests intradermiques égal à 12 jours ou à 465 jours). Au final, l'échantillon qui a pu être étudié comportait 1294 animaux indemnes (951 inclus dans le cadre du protocole, et 343 animaux en SR) et 39 animaux infectés (21 animaux inclus dans le protocole et 18 en SR).

Il est impératif de rappeler que les animaux indemnes de notre échantillon étaient issus de 432 élevages répartis sur 04 départements (les Ardennes (08), la Côte-d'Or (21), la Dordogne (24) et la Haute Vienne (87) et que tous les animaux en SR étaient en provenance de la Dordogne. Les animaux infectés de notre échantillon quant à eux, ils étaient issus de 24 élevages et se répartissaient également sur quatre départements (la Charente (16), la Côte-d'Or (21), la Dordogne (24), et Lot-et-Garonne (47))

et les animaux infectés en SR étaient tous en provenance du 24. Le **tableau 05** suivant reprend en détaille la provenance des animaux inclus dans chaque département :

**Tableau 05** : Répartition des animaux inclus dans le protocole expérimental selon le département de provenance et le statut infectieux des animaux

Statut infectieux	Département	Nombre d'animaux	Nombre d'élevages
Indemnes	les Ardennes (08)	15	4
	la Côte-d'Or (21)	448	209
	la Dordogne (24)	830	252
	la Haute Vienne (87)	1	1
<b>Total indemnes</b>		<b>1294</b>	<b>466</b>
Infectés	la Côte-d'Or (21)	2	2
	la Dordogne (24)	35	22
	Lot-et-Garonne (47)	2	2
<b>Total infectés</b>		<b>39</b>	<b>26</b>

Le test réalisé en première intention était une IDS pour 62,1 % des animaux indemnes, soit 49,2 % (467 / 951) des animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole. Le premier test était une IDC pour 37,9% des animaux indemnes, soit 50,1 % (484 / 951) des animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole. Tous les animaux infectés ont été testé par une IDS lors des tests cutanés réalisés au premier contrôle.

#### Délais retenus

L'idéal était de ne garder pour les analyses statistiques que les animaux dont le délai entre les deux tests cutanés (délais Inter-IDT) était de 42 jours, les animaux dont le délai entre le premier test d'IFN et le premier test cutané (délai IDT1-IFN1) était de 3 à 8 jours et ceux dont le délai entre le second test IFN et le second test cutané (délai IDT2-IFN2) était de zéro jours (la prise de sang pour la réalisation de l'IFN2 le même jours de la réalisation de l'IDT2).

Mais en raison du faible nombre d'animaux infectés, tous les animaux ont été gardés pour les analyses avec des délais Inter-IDT variant entre 35<sup>1</sup> et 68 jours, des délais IDT1-IFN1 variant de 0<sup>2</sup> à 8 jours pour les animaux inclus dans le cadre du protocole et de 0 jours pour les animaux en SR et enfin, des délais IFN2-IDT2 de 3 jours maximum pour les animaux inclus dans le cadre du protocole et de 0 jour pour les animaux en SR. Concernant les animaux indemnes et pour rester cohérent avec les délais retenus pour les animaux infectés, les délais entre les tests réalisés, retenus pour nos analyses statistiques étaient : Délai Inter-IDT variant de 28<sup>1</sup> à 79 jours, des délais IDT1-IFN1 variant de 0<sup>2</sup> à 8 jours pour les animaux inclus dans le cadre du protocole et allant de 5 jours avant la réalisation du premier test cutané a 0 jour pour les animaux en SR et enfin, des délais IFN2-IDT2 de 1 jour maximum pour les animaux inclus dans le cadre du protocole et de 0 jour pour les animaux en SR.

## 2. Etude de la validité des tests employés

L'un des objectifs de ce protocole expérimental était de déterminer les caractéristiques de sensibilité et de spécificité, conditionnelles a une réaction initiale non négative, des tests IFN et IDT2. Comme indiqué ci-dessus, les sensibilités et spécificités ont été calculées dans un échantillon homogène d'animaux ne comportant que ceux qui avaient obtenu un résultat non négatif en IDT1 de façon à éliminer de nos calculs les animaux inclus en SR qui présentaient des résultats négatifs a l'IDT1, chez qui les autres tests ont été réalisés quel que soit le résultat de la première IDT.

<sup>1</sup> Ce délai entre ID de 35 jours était trop court au vu de la réglementation française et européenne.

<sup>2</sup> Le délai de 0 jour correspondait aux animaux pour lesquels la date d'ID indiquée sur le compte-rendu correspondait à la date de lecture des résultats.

Au total, 811 animaux parmi les 1294 animaux indemnes ont été retenus pour le calcul de la spécificité et 26 animaux parmi les 39 animaux infectés ont été retenus pour le calcul de la sensibilité des tests.

## 2.1. Calcul de la spécificité des tests employés

Les résultats des quatre tests étudiés pour les 811 animaux indemnes ayant obtenu un résultat non négatif à l'IDT1 sont regroupés dans le **tableau 06** ci-après ; il a été décidé de regrouper en non négatifs, noté « NON NEG », les résultats douteux / positifs aux tests intradermique (IDT1 pour le test intradermique à J0 et IDT2 pour le test intradermique à J42) ainsi que les résultats positifs / non conclusifs pour l'interféron (IFN1 pour le test interféron effectué entre J3 et J8 et IFN2 pour le test interféron effectué à J42). Ce choix a été motivé par le fait que la réglementation française et européenne prévoit qu'un animal ayant obtenu des résultats non négatifs soit considéré comme suspect. Les résultats négatifs sont notés « NEG ».

**Tableau 06** : Résultats des quatre tests chez les 811 animaux indemnes ayant obtenu un résultat non négatif en IDT1

	IDT1	IDT2	IFN1	IFN2
NEG	0	719	385	523
NON NEG	811	92	426	288
TOTAL	811	811	811	811

NON NEG : non négatif, NEG : négatif, IDT : intradermotuberculination, IFN : test de dosage de l'interféron gamma

Les spécificités estimées pour les quatre tests étudiés, notées « Sp », étaient les suivantes : (pour mémoire, il s'agit de spécificités conditionnelles à l'obtention d'un résultat non négatif en ID) :

- Sp IDT2 = 88,6 % [86,3 % ; 96,6 %] Intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %)
- Sp IFN1 = 47,5 % [44,1 % ; 50,9 %] IC 95 %
- Sp IFN2 = 64,5 % [61,1 % ; 67,7 %] IC 95 %

Le test IDT2 était significativement plus spécifique que l'IFN1 (Test de Mc Nemar,  $p = 2,36 \times 10^{-61}$ ) et l'IFN1 était moins spécifique que l'IFN2 (Test de Mc Nemar,  $p = 7,38 \times 10^{-39}$ ).

Afin de comprendre l'impact de l'IDS et de l'IDC sur l'IFN, les spécificités ont également été estimées séparément chez les animaux ayant été testé par une IDS lors du premier IDT et chez les animaux ayant été testé par une IDC (**Annexe XV**). Les valeurs de la spécificité individuelle calculées séparément chez les animaux indemnes ayant reçu une IDS à l'IDT1 et ceux ayant reçu une IDC à l'IDT1, n'étaient pas significativement différentes de celles calculées précédemment, et le test intradermique était toujours plus spécifique que les tests de dosage de l'interféron quelle que soit la technique utilisée à l'occasion de l'IDT1.

Comme nous l'avons souligné précédemment, les animaux n'étaient pas tous inclus de la même manière dans la base de données. Les spécificités des tests ont donc également été estimées séparément chez les animaux dits "Protocole" et chez ceux dits "SR" :

### Animaux inclus dans le protocole

Parmi les 951 animaux indemnes inclus dans le cadre de protocole, 942 ont présenté un résultat non négatif à l'IDT1. Les résultats des quatre tests pour ces 942 animaux sont présentés dans le **tableau 07** suivant :

**Tableau 07** : Résultats des quatre tests chez les 942 animaux indemnes inclus dans le protocole et ayant obtenu des résultats non négatifs en IDT1

	IDT1	IDT2	IFN1	IFN2
NEG	0	831	467	579
NON NEG	942	111	475	363
TOTAL	942	942	942	942

NON NEG : non négatif, NEG : négatif, IDT : intradermotuberculination, IFN : test de dosage de l'interféron

La spécificité « Sp » des tests effectués sur les animaux inclus dans le cadre du protocole était de (pour mémoire, il s'agit de spécificités conditionnelles à l'obtention d'un résultat non négatif en ID) :

- Sp IDT2 = 88,2 % [86,0 % ; 90,1 %] IC 95 %

- Sp IFN1 = 49,6 % [46,4 % ; 52,8 %] IC 95 %

- Sp IFN2 = 61,5 % [58,3 % ; 64,5%] IC 95 %

Ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles calculées précédemment (en cumulant animaux provenant de SR et Protocole). L'IDT2 était plus spécifique que l'IFN1 (Test de Mc Nemar,  $p = 2,94 \times 10^{-64}$ ) et plus spécifique que l'IFN2 ( $p = 1,34 \times 10^{-40}$ ), mais l'IFN1 était moins spécifique que l'IFN2 (Test de Mc Nemar,  $p = 2,89 \times 10^{-10}$ ).

### Animaux en SR

Parmi les 343 animaux indemnes inclus en SR, 48 ont présenté un résultat non négatif à l'IDT1, les résultats des quatre tests pour ces 37 animaux sont regroupés dans le tableau **08** suivant :

**Tableau 08** : Résultats des quatre tests chez les 48 animaux indemnes en SR et ayant obtenu un résultat non négatif en IDT1

	IDT1	IDT2	IFN1	IFN2
NEG	0	43	30	28
NON NEG	48	5	18	20
TOTAL	48	48	48	48

NON NEG : non négatif, NEG : négatif, IDT : intradermotuberculination, IFN : test de dosage de l'interféron

Les spécificités « Sp » des tests effectués sur les animaux en SR étaient de (pour mémoire, il s'agit de spécificités conditionnelles à l'obtention d'un résultat non négatif en ID) :

- Sp IDT2 = 89,6 % [77,8 % ; 95,5 %] IC 95 %

- Sp IFN1 = 62,5 % [48,4 % ; 74,8 %] IC 95 %

- Sp IFN2 = 58,3 % [44,3 % ; 71,2 %] IC 95 %

Comme précédemment, le test IDT2 était plus spécifique que l'IFN1 (Test de Mc Nemar,  $p = 0,0059$ ) et l'IFN2 était significativement ( $p = 0,002$ ) moins spécifique que l'IDT2, mais aucune différence significative entre les spécificités de l'IFN1 et de l'IFN2 n'a été mise en évidence (Test de Mc Nemar,  $p = 0,802$ ).

### **2.2. Calcul de la sensibilité des tests employés**

Les résultats des quatre tests pour les 26 animaux infectés ayant obtenu un résultat non négatif à l'IDT1 sont présentés dans le **tableau 09** ci-après. Comme précédemment, les résultats douteux / positifs aux tests intradermiques ainsi que les résultats positifs / non conclusifs pour le test de dosage d'interféron ont été regroupés en non négatifs, notés « NON NEG ». Les résultats négatifs sont notés « NEG ».

**Tableau 09** : Résultats des quatre tests chez les 26 animaux infectés ayant obtenu un résultat non négatif à l'IDT1

	IDT1	IDT2	IFN1	IFN2
NON NEG	26	13	25	26
NEG	0	13	1	0
TOTAL	26	26	26	26

NON NEG : non négatif, NEG : négatif, IDT : intradermotuberculination, IFN : test de dosage de l'interféron

Les sensibilités estimées pour les quatre tests (conditionnelles à l'obtention préalable d'un résultat non négatif en IDT1) étaient les suivantes :

- Se IDT2 = 50,0 % [32,0 %; 68,0 %] IC 95 %
- Se IFN1 = 96,0 % [81,0 %; 99,0 %] IC 95 %
- Se IFN2 = 100 % [87,0 %; 100 %] IC 95 %

L'IFN1 était significativement plus sensible que l'IDT2 (Test de Mc Nemar,  $p = 0,003$ ). Il n'existait pas de différence significative entre les deux sensibilités de l'IFN1 et l'IFN2 (Test de Mc Nemar,  $p = 1$ ).

Comme précédemment, nous avons refait les calculs séparément chez les animaux dits "Protocole" et chez ceux dits "SR" :

#### Animaux inclus dans le protocole

Les 21 animaux infectés inclus dans le cadre de protocole ont tous présenté un résultat non négatif à l'IDT1, les résultats des quatre tests pour ces animaux sont regroupés dans le **tableau 10** suivant :

**Tableau 10** : Résultats des quatre tests chez les 21 animaux infectés inclus dans le protocole

	IDT1	IDT2	IFN1	IFN2
NON NEG	21	10	20	21
NEG	0	11	1	0
TOTAL	21	21	21	21

NON NEG : non négatif, NEG : négatif, IDT : intradermotuberculination, IFN : test de dosage de l'interféron

Ainsi, nous avons obtenu les sensibilités (conditionnelles à l'obtention préalable d'un résultat non négatif en IDT1) suivantes :

- Se IDT2 = 47,6 % [28,3 %; 67,6 %] IC 95 %
- Se IFN1 = 95,2 % [77,3 %; 99,2 %] IC 95 %
- Se IFN2 = 100 % [84,5 %; 100%] IC 95 %

L'IFN1 et l'IFN2 étaient significativement plus sensibles que l'IDT2 (Test de Mc Nemar,  $p = 0,009$  et  $p = 0,002$  respectivement) et la sensibilité de l'IFN1 était similaire à celle de l'IFN2 (Test de Mc Nemar,  $p = 1$ ).

#### Animaux en SR

Parmi les 28 animaux infectés inclus en SR, cinq ont présenté un résultat non négatif à l'IDT1, les résultats des quatre tests pour ces quatre animaux sont regroupés dans le **tableau 11** suivant :

**Tableau 11** : Résultats des quatre tests chez les cinq animaux infectés inclus en SR et ayant obtenu des résultats non négatifs en IDT1

	IDT1	IDT2	IFN1	IFN2
NON NEG	5	3	5	5
NEG	0	2	0	0
TOTAL	5	5	5	5

NON NEG : non négatif, NEG : négatif, IDT : intradermotuberculination, IFN : test de dosage de l'interféron

Le calcul de la sensibilité des tests était rendu impossible par le faible nombre d'animaux dont nous disposions. Cependant, nous pouvons constater que 3 animaux sur 5 ont été détectés comme étant non négatifs par l'IDT2 et 5 sur 5 par les tests IFN1 et IFN2.

L'analyse statistique des données collectées lors de ces deux campagnes de prophylaxie a permis d'établir que la sensibilité du test IFN réalisé entre 3 et 8 jours (96,0 % [81,0% ; 99,0%] IC 95%) était significativement supérieure à celle de l'IDT de recontrôle (50,0 % [32,0% ; 68,0%] IC 95%). En revanche, la spécificité de l'IDT de recontrôle (88,6 % [86,3% ; 96,6%] IC 95%) était plus élevée que celle du test IFN réalisé entre 3 et 8 jours (47,5 % [44,1% ; 50,9 %] IC 95%). Par ailleurs, la spécificité de l'IFN réalisée entre 3 et 8 jours estimée chez les animaux inclus dans le cadre du protocole (49,6 % [46,4% ; 52,8%] IC 95%) était moins bonne que celle estimée chez les animaux en SR (62,5 % [48,4% ; 74,8%] IC 95%).

### 3. Approche de l'influence de l'injection de tuberculine sur les résultats qualitatifs du test de dosage de l'interféron gamma

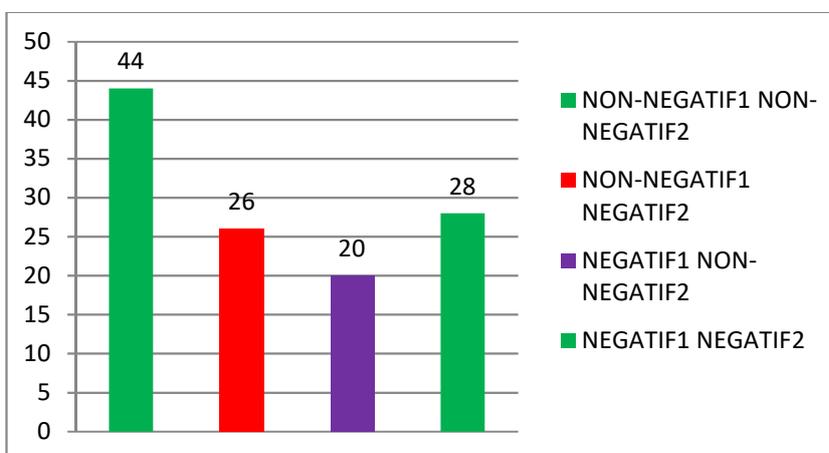
Afin d'étudier l'influence de l'injection de tuberculine sur les résultats d'IFN, nous nous sommes intéressés par la répartition des animaux suivant leurs combinaisons de résultats aux quatre tests (IDT1, IDT2, IFN1 et IFN2). Pour rappel, IDT1 est le test d'intradermotuberculination réalisé à J0, IDT2 est le test d'intradermotuberculination réalisé à J42, IFN1 est le test d'interféron réalisé entre J3 et J8 et enfin IFN2 est le test d'interféron réalisé à J42.

Comme indiqué précédemment, la succession des tests n'était pas la même chez les animaux en SR et chez ceux entrés dans le protocole. Pour les animaux entrés dans le protocole, la tuberculine du test IDT1 était injectée avant la réalisation du test IFN1. En revanche, la tuberculine du test IDT2 était injectée après le prélèvement de sang effectuée en vue du test IFN2. Pour les animaux en SR, les prélèvements sanguins en vue des tests IFN étaient effectués avant les IDT. Les résultats des animaux inclus dans le protocole et des animaux en SR ont donc été analysés séparément.

#### 3.1. Les animaux indemnes

##### Animaux inclus dans le protocole

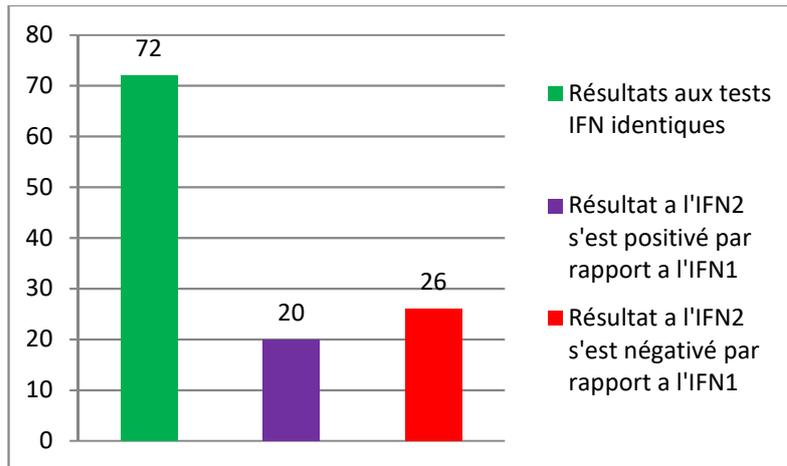
Le statut infectieux des animaux (notamment vis-à-vis des mycobactéries non tuberculeuses responsables de réactions croisées) peut évoluer entre les deux séries de tests (IDT1-IFN1 d'une part et IDT2-IFN2 d'autre part). Pour s'assurer que le statut infectieux des animaux vis-à-vis d'éventuelle contaminations par des mycobactéries non tuberculeuses responsables de réactions croisées évoluait peu, afin de comparer les deux résultats aux tests interféron et de mettre en évidence un effet éventuelle de l'injection de tuberculine sur ces résultats, nous avons choisi d'isoler les animaux pour lesquels les résultats à l'IDT1 et à l'IDT2 étaient « identiques ». Cela concernait 118 animaux parmi 951 bovins indemnes inclus dans le cadre de protocole, dont les résultats sont représentés dans la **figure 04** suivante.



**Figure 04** : Répartition des 118 animaux indemnes inclus dans le cadre de protocole dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude, suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2.

Nous observons dans cet histogramme que le pourcentage des animaux ayant obtenu des résultats non-négatifs à l'IFN1 (59,3 % = 70/118) n'était pas significativement différent (Test de Mc Nemar,  $p = 0,46$ ) du pourcentage des animaux non-négatifs à l'IFN2 (54,2 % = 64/118). Cependant, les analyses faite sur les résultats qualitatifs du test Bovigam seul (l'UE européenne recommande l'utilisation du test Bovigam seul, c'est-à-dire la PPD aviaire et la PPD bovine sans rajouter le MIX) ont montré que cette différence était significative (**Annexe XVI**).

La **figure 05** ci-dessous, représente la répartition des 118 animaux indemnes dans trois catégories de profils de résultats IFN différentes. La première catégorie (en vert) correspond aux animaux ayant présenté un résultat identique (négatif / non-négatif) aux deux tests IFN, la seconde (en violet) correspond aux animaux qui présentaient un résultat négatif a l'IFN1 puis un résultat non-négatif à l'IFN2 et la troisième et dernière catégorie (en rouge) correspond aux animaux ayant présenté un résultat non-négatif à l'IFN1 et un résultat négatif a l'IFN2.



**Figure 05** : Répartition des 118 animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude dans les trois catégories de profils de résultats IFN

Nous constatons que le nombre d'animaux de la première catégorie (en vert) pour lesquels les résultats aux deux IFN étaient identiques était plus important que le nombre d'animaux des deux autres catégories regroupées (pour lesquels la réponse IFN avait varié). D'autre part, parmi les animaux dont le résultat IFN a varié, le nombre d'animaux pour lesquels le résultat d'IFN s'était «négativé» était supérieure au nombre d'animaux pour lesquels la réponse s'était positivée.

Comme nous l'avons souligné précédemment, la littérature tend à montrer que l'impact de l'IDS et celui de l'IDC sur l'IFN ne sont probablement pas strictement identiques. Afin de comprendre l'impact de l'IDS et de l'IDC sur l'IFN, l'analyse a donc ensuite été effectuée séparément chez les animaux ayant été testé par une IDS lors de l'IDT1 et chez les animaux ayant été testé par une IDC (**Annexe XV**).

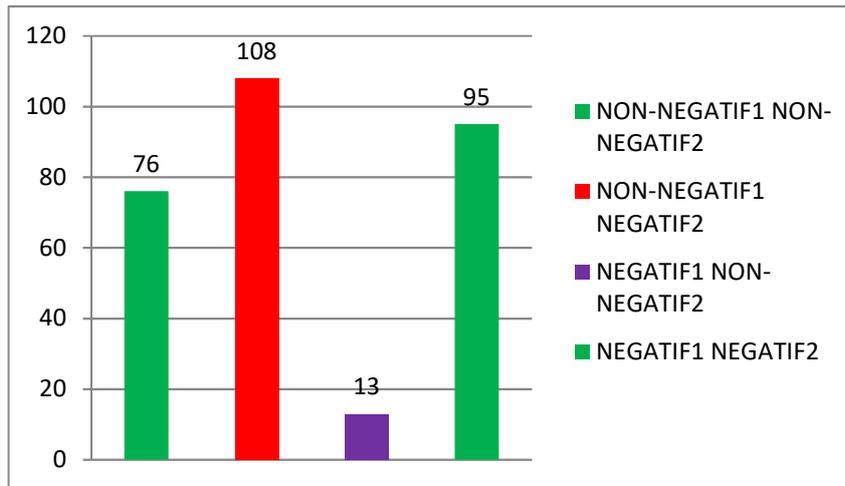
Les analyses faites sur les animaux indemnes ayant reçu une IDS lors du premier test d'IDT ne montrent aucun effet de l'injection de tuberculine sur les résultats des tests IFN. Il en est de même pour les animaux indemnes ayant subi une IDC lors de l'IDT1 (cf. Discussion).

#### Animaux inclus dans en SR

Comme nous l'avons précisé précédemment, les animaux en suivi renforcé « SR » ont pour particularité que la prise de sang pour le test IFN1 soit faite le même jour que l'IDT1, ce qui suggère que les résultats du test IFN1 ne seront pas influencés par la tuberculination. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier la répartition de ces animaux suivant leurs combinaisons de résultats aux quatre tests (IDT1, IDT2, IFN1 et IFN2).

Comme pour les animaux inclus dans le cadre du protocole, afin de s'assurer que le statut infectieux (en particulier concernant les mycobactéries non tuberculeuses) évoluait peu, afin de comparer les deux résultats aux tests IFN, les animaux pour lesquels les résultats à l'IDT1 et à l'IDT2 étaient identiques.

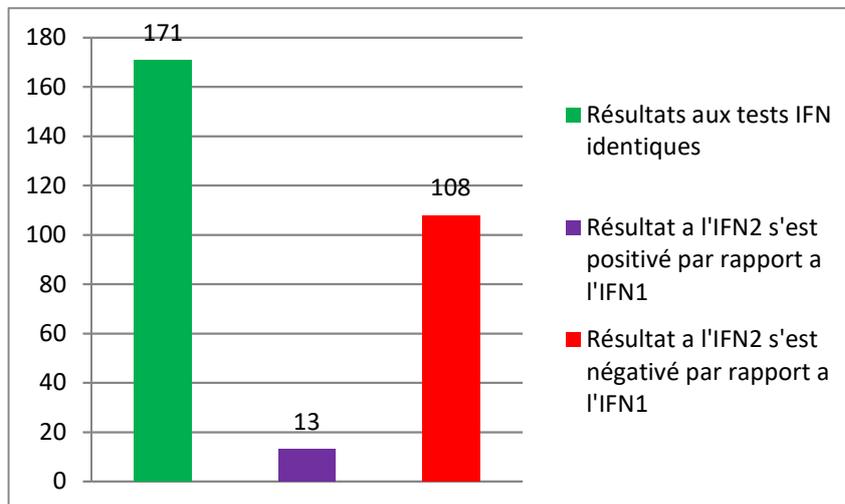
Au total 292 animaux avaient des résultats identiques aux tests cutanés. Leurs résultats sont présentés dans la **figure 06** suivante :



**Figure 06** : Répartition des 292 animaux indemnes en SR dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2.

Nous observons dans cet histogramme que le pourcentage des animaux à résultat non-négatif à l'IFN1 (63 % = 184/292) était significativement différent (test de Mc Nemar,  $p = 1,28 \times 10^{-17}$ ) du pourcentage des animaux non-négatifs à l'IFN2 (30,5 % = 89/292). Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats qualitatifs du test Bovigam seul (**Annexe XVI**)

La répartition des 292 animaux indemnes dans trois catégories de profils de résultats IFN différentes est présentée dans la **figure 07** suivante :



**Figure 07** : Répartition des 292 animaux indemnes en SR dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude dans les trois catégories de profils de résultats IFN

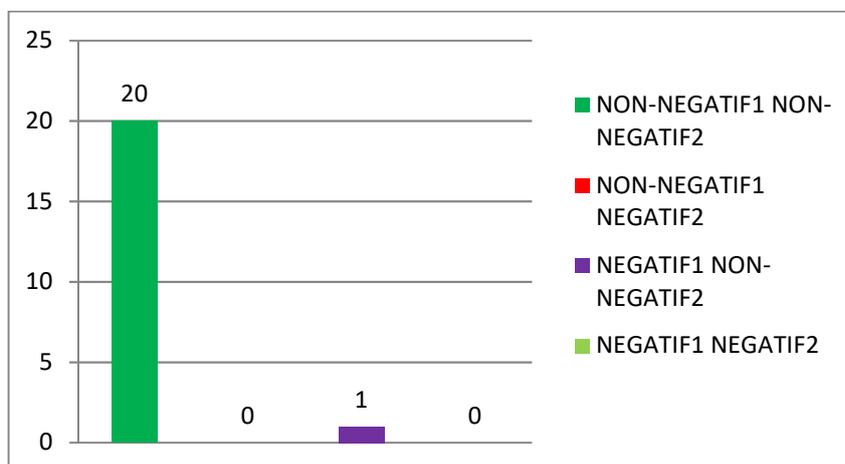
Nous constatons que le nombre d'animaux de la première catégorie (en vert) pour lesquels les résultats aux deux IFN étaient identiques était supérieur au nombre d'animaux des deux autres catégories regroupées (pour lesquels la réponse IFN avait varié). D'autre part, parmi les animaux dont le résultat IFN avait varié, le nombre d'animaux pour lesquels le résultat d'IFN s'était « négativé » était nettement supérieur au nombre d'animaux pour lesquels la réponse s'était « positivée ».

### 3.2. Les animaux infectés

#### Animaux inclus dans le protocole

Dans la même logique, nous avons étudié la répartition des animaux infectés suivant leurs combinaisons de résultats aux quatre tests (IDT1, IDT2, IFN1 et IFN2) pour mieux comprendre l'effet de la tuberculine injectée à J0 sur les résultats de test de dosage de l'interféron.

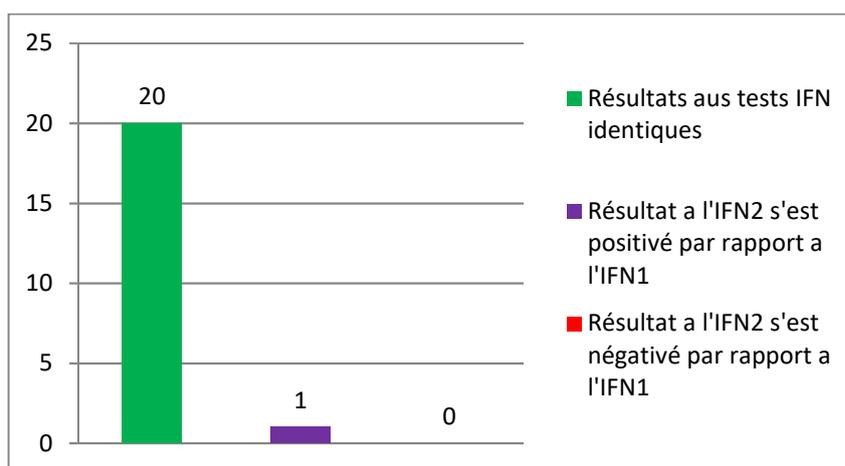
Un total de 21 bovins infectés inclus dans le cadre de protocole dont les résultats aux deux IFN sont représentés dans la **figure 08** suivante :



**Figure 08** : Répartition des 21 animaux infectés inclus dans le cadre de protocole suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2.

Nous observons dans cet histogramme que les pourcentages des animaux non-négatifs aux tests IFN1 et 2 sont quasiment identiques (test de Mc Nemar,  $p = 1$ ). Des résultats similaires ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats qualitatifs du test Bovigam seul (**Annexe XVI**)

Par ailleurs, la **figure 09** ci-après, représente la répartition des 21 animaux infectés dans trois catégories de profils de résultats IFN différentes.



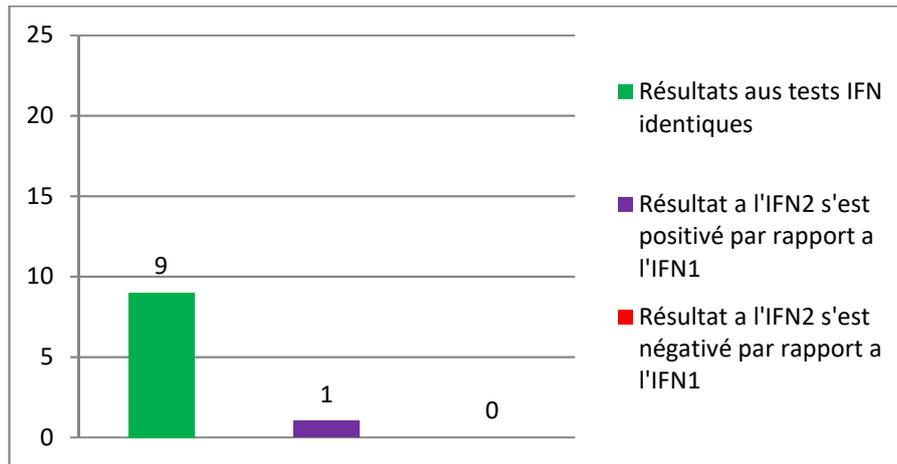
**Figure 09** : Répartition des 21 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole dans les trois catégories de profils de résultats IFN

Le nombre d'animaux de la première catégorie (en vert) pour lesquels les résultats aux deux IFN étaient identiques était plus grand que le nombre d'animaux des deux autres catégories regroupées (pour

lesquels la réponse IFN avait varié), qui comptaient un seul animal qui s'était positivé l'occasion du deuxième test IFN.

Pour s'assurer que le statut infectieux évoluait peu, afin de comparer les deux résultats aux tests interféron et de mettre en évidence un effet éventuelle de l'injection de tuberculine sur ces résultats, il aurait été plus pertinent d'isoler les animaux pour lesquels les résultats aux IDT1 et 2 étaient identiques. Cela ne concernait que cinq animaux.

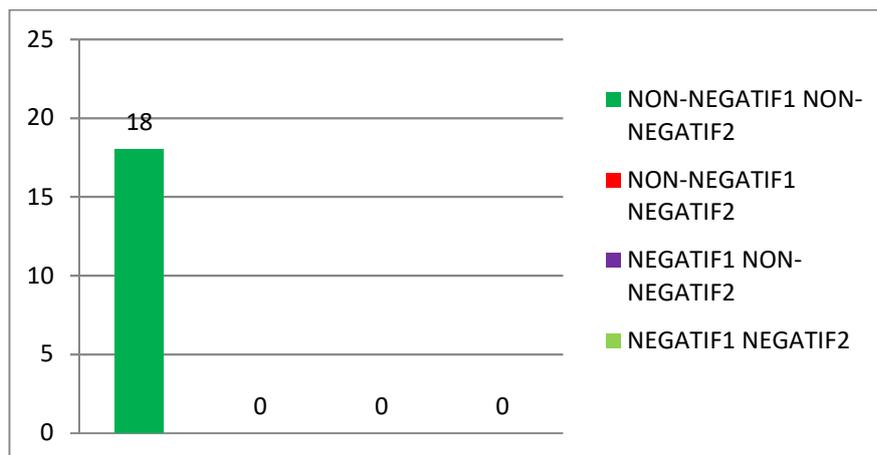
Comme illustré dans la **figure 10** ci-après, la répartition de ces 10 animaux infectés inclus dans le cadre de protocole dont les résultats d'IDT n'avaient pas varié au cours de l'étude, dans les trois catégories de profils de résultats IFN montre qu'à l'exception d'un seul animal qui s'est positivé à l'occasion de l'IFN2, les animaux ont tous fourni des résultats identiques (négatif ou non-négatif) aux deux tests d'interféron et aucun animal ne s'est négativé à l'IFN2.



**Figure 10** : Répartition des 10 animaux infectés inclus dans le cadre de protocole dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2.

Animaux inclus dans en SR

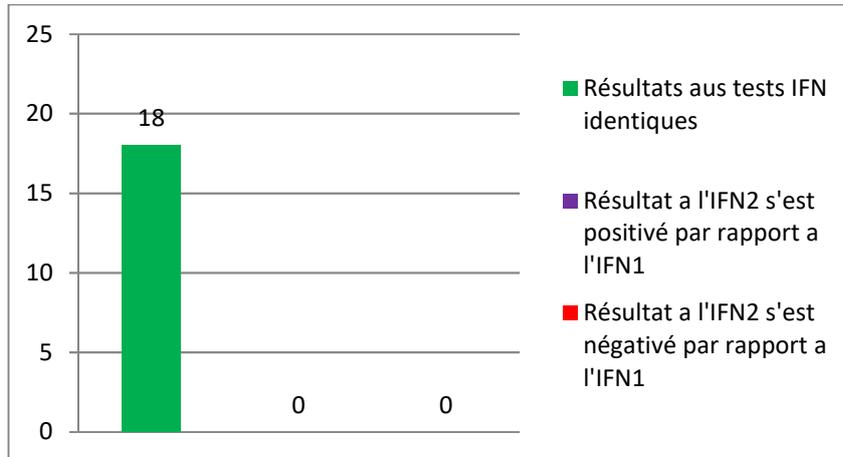
Un total de 18 bovins infectés en SR dont les résultats aux deux IFN sont représentés dans la **figure 11** suivante.



**Figure 11** : Répartition des 18 animaux infectés en SR suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2.

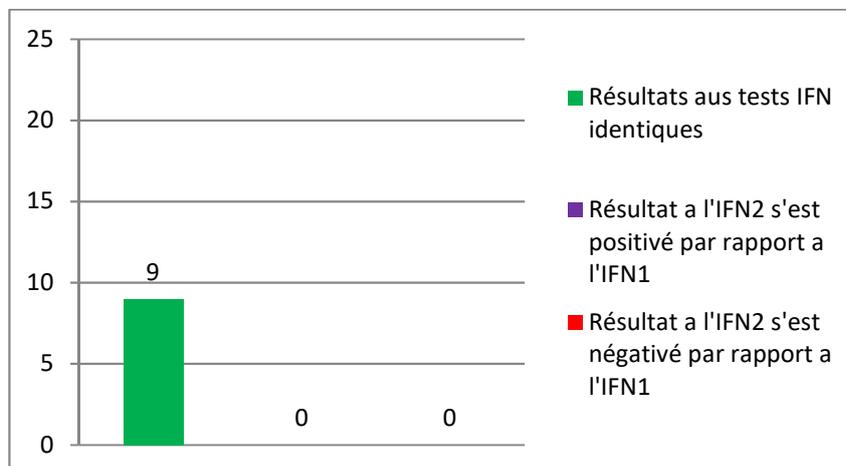
Nous observons dans cet histogramme que tous les animaux ont fourni un résultat non-négatif aux deux tests IFN. Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats qualitatifs

du test Bovigam seul (**Annexe XVI**). La **figure 12** ci-dessous, qui présente la répartition de ces 18 animaux dans les trois catégories de profils de résultats IFN explicitées précédemment, montre clairement que tous les animaux (18) ont fourni un résultat identique (négatif ou non-négatif) aux deux IFN.



**Figure 12** : Répartition des 18 animaux infectés en SR dans les trois catégories de profils de résultats IFN

Dans la même logique et afin de s'assurer que le statut infectieux évoluait peu, afin de comparer les deux résultats aux tests interféron, l'isolement des animaux pour lesquels les résultats aux IDT étaient concordants aurait été plus pertinent. Seuls neuf animaux avaient des résultats identiques aux tests cutanés. Comme le montre la **figure 13** suivante, tous les animaux (neuf) ont fourni un résultat identique (négatif ou non négatif) aux tests IFN 1 et 2.



**Figure 13** : Répartition des neuf animaux infectés en SR dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude suivant leurs résultats aux tests IFN1 et IFN2.

Pour les animaux indemnes inclus dans le protocole, la proportion des animaux réagissant à l'IFN1 n'était pas significativement différente de celle des animaux réagissant à l'IFN2. Par ailleurs, le nombre d'animaux de la catégorie d'animaux pour laquelle les résultats aux deux IFN étaient identiques était supérieur au nombre d'animaux des deux autres catégories regroupées (pour lesquels la réponse IFN avait varié). D'autre part, parmi les animaux dont le résultat IFN avait varié, le nombre d'animaux pour lesquels le résultat d'IFN s'était « négative » était nettement supérieur au nombre d'animaux pour lesquels la réponse s'était « positive ». Cette différence était significative lorsque le résultat d'IFN était interprété sur la base du Bovigam seul. En revanche, chez les animaux indemnes en SR, la proportion des animaux réagissant à l'IFN1 était significativement différente de celle des animaux réagissant à l'IFN2.

Concernant les animaux infectés, Nous avons observé que les pourcentages des animaux positifs aux tests IFN1 et 2 étaient quasiment identique (test de Mc Nemar,  $p = 1$ ). Par ailleurs, le nombre d'animaux de la catégorie d'animaux pour lesquels les résultats aux deux IFN étaient identiques était plus grand que le nombre d'animaux des deux autres catégories regroupées (pour lesquels la réponse IFN avait varié). D'autre part, un seul animal s'était positif à l'occasion du deuxième test IFN.

#### 4. Approche de l'influence de l'injection de tuberculine sur les résultats quantitatifs du test de dosage de l'interféron gamma

Rappel : En France, les résultats de dosage de l'interféron gamma sont fournis sous la forme d'une proportion de densité optique (DO) (rapportée aux résultats de DO fournis par les témoins négatif (TN) et positif (TP) et non d'une DO brute. Le principe de cette analyse consistait à utiliser les ratios PPD, PPDB et MIX, calculés à partir des densités optiques selon les formules indiquées ci-dessus.

L'objectif de cette partie de l'étude était d'étudier les variations de la réponse immunitaire des animaux en suivant l'évolution des résultats d'IFN et des tests cutanés à J3 et à J42, chez les animaux inclus dans le protocole d'une part et chez ceux en SR d'autre part.

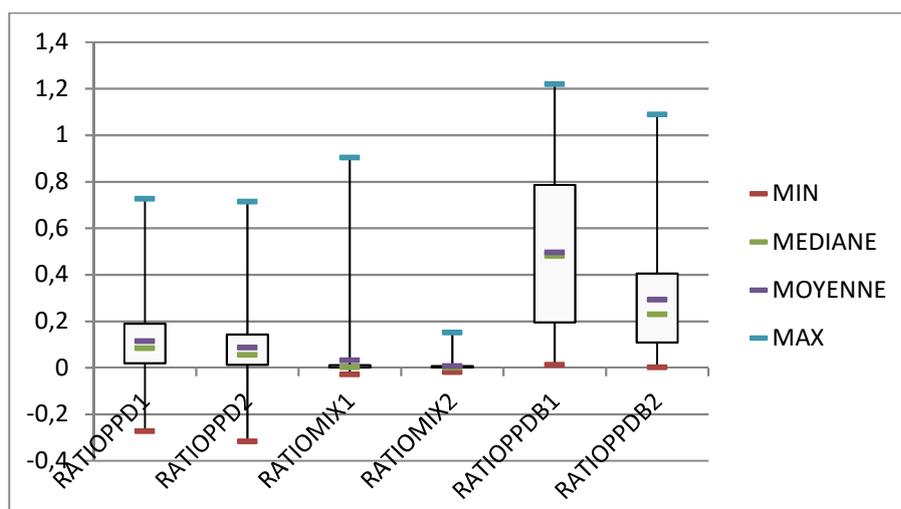
##### 4.1. Chez les animaux indemnes

Animaux inclus dans le protocole

Le **tableau 12** suivant résume pour les 118 bovins indemnes inclus dans le cadre de protocole, les paramètres statistiques obtenus pour les ratios des PPD, PPDB et MIX pour les tests IFN. **La figure 14** ci-après schématise ces résultats sous forme d'un graphique.

**Tableau 12** : Paramètres statistiques des ratios PPD et MIX pour les 118 bovins indemnes inclus dans le cadre du protocole, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude

	RATIOPPD1	RATIOPPD2	RATIOPPDB1	RATIOPPDB2	RATIOMIX1	RATIOMIX2
1 <sup>er</sup> QUARTILE	0,01925	0,0125	0,001	0,001	0,1955	0,109
MINIMUM	-0,271	-0,316	-0,027	-0,017	0,014	0,003
MEDIANE	0,085	0,056	0,003	0,002	0,482	0,232
MOYENNE	0,116	0,089	0,034	0,009	0,497	0,295
MAXIMUM	0,728	0,716	0,905	0,152	1,221	1,091
3 <sup>ème</sup> QUARTILE	0,19025	0,14275	0,011	0,007	0,78625	0,40525



**Figure 14** : Valeurs RATIO des densités optiques montrant la production *in vitro* d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 118 animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole et dont les résultats d'IDT n'ont pas varié au cours de l'étude.

On observe sur la **figure 14** une diminution globale des densités optiques entre le premier et le second test. La production médiane d'IFN suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente, selon l'existence d'une injection préalable (J3) ou non (J42) (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,38 \times 10^{-10}$ ). Il en était de même concernant le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 7,37 \times 10^{-05}$ ). Avec la PPD aviaire en revanche, la différence n'était pas significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,06$ ). La réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42, et ce, dans tous les cas. Des résultats similaires ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul (**Annexe XVI**)

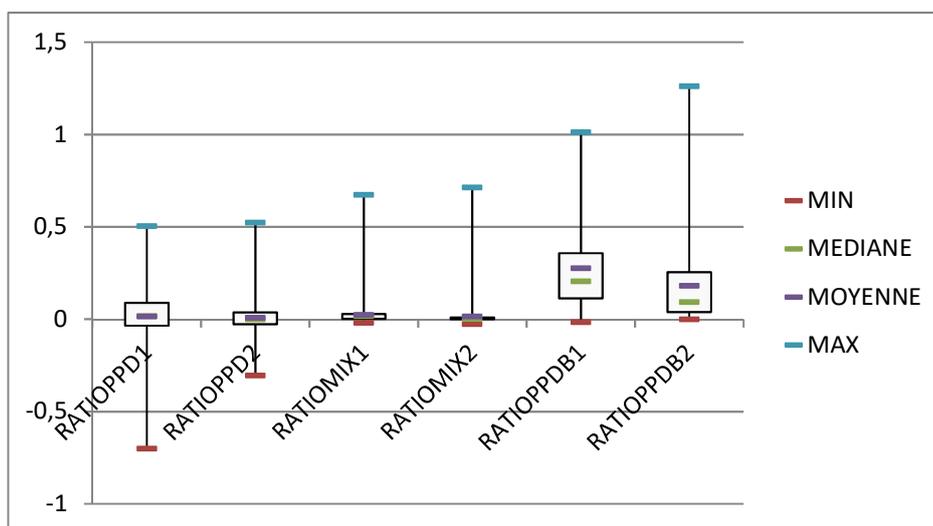
La même démarche que précédemment a été appliquée en séparant les animaux ayant subi une IDS en première intention de ceux qui ont subi une IDC (**Annexe XV**). Les résultats obtenus en séparant les animaux selon la nature de l'IDT1 étaient très similaires à ceux obtenus en les regroupant.

### Animaux en SR

Au total 292 animaux indemnes avaient des résultats identiques aux tests cutanés, dont les résultats sont présentés dans le **tableau 13** ci-dessous et dans la **figure 15** ci-après.

**Tableau 13** : Paramètres statistiques des ratios PPD et MIX pour les 292 bovins indemnes en SR, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude

	RATIOPPD1	RATIOPPD2	RATIOPPDB1	RATIOPPDB2	RATIOMIX1	RATIOMIX2
1 <sup>er</sup> QUARTILE	-0,03475	-0,027	0,003	0,001	0,113	0,03775
MINIMUM	-0,700	-0,303	-0,018	-0,025	-0,015	0,001
MEDIANE	0,018	0,001	0,017	0,003	0,207	0,095
MOYENNE	0,016	0,008	0,025	0,016	0,277	0,182
MAXIMUM	0,506	0,525	0,674	0,715	1,013	1,262
3 <sup>ème</sup> QUARTILE	0,088	0,03725	0,028	0,009	0,358	0,255



**Figure 15** : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 292 animaux indemnes en SR et dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude.

On peut noter une diminution globale des densités optiques entre le premier et le second test (**Figure 15**). La différence était non significative pour la PPD aviaire (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,28$ ). En revanche, la production médiane d'interféron suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente entre J3 et J42 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,02 \times 10^{-10}$ ). Il en était de même pour les moyennes obtenus avec le MIX (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,001$ ). Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul (**Annexe XVI**)

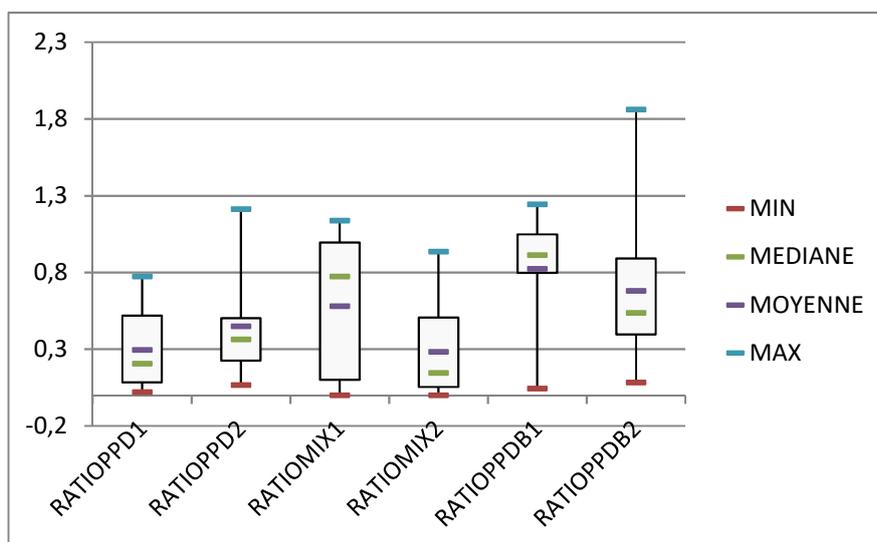
#### 4.2. Chez les animaux infectés

##### Animaux inclus dans le protocole

Le **tableau 14** suivant résume pour les 21 bovins infectés inclus dans le cadre de protocole, les moyens, médians, premiers et troisièmes quartiles ainsi que le minimum et le maximum obtenus pour les ratios des PPD, PPDB et MIX aux tests IFN. Les résultats sont présentés graphiquement dans la **figure 16** ci-après.

**Tableau 14** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 21 bovins infectés inclus dans le cadre du protocole

	RATIOPPD1	RATIOPPD2	RATIOPPDB1	RATIOPPDB2	RATIO MIX1	RATIO MIX2
1 <sup>er</sup> QUARTILE	0,084	0,226	0,102	0,054	0,797	0,396
MINIMUM	0,022	0,067	0,002	0,001	0,046	0,084
MEDIANE	0,208	0,365	0,774	0,148	0,914	0,538
MOYENNE	0,29714286	0,450	0,58057143	0,285	0,824142857	0,682
MAXIMUM	0,774	1,214	1,139	0,937	1,244	1,862
3 <sup>ème</sup> QUARTILE	0,519	0,502	0,996	0,506	1,048	0,892



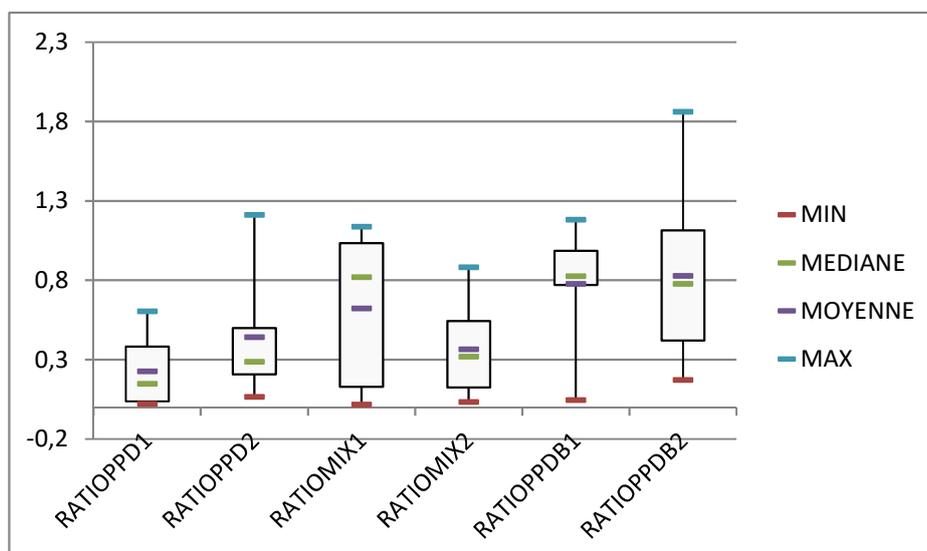
**Figure 16** : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 21 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole.

On peut noter une diminution globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test (sauf pour le ratio PPD). Le test de Wilcoxon pour échantillons appariés (taille de notre effectif < 30) nous permet de conclure que les médianes de la production d'interféron suite à la stimulation par la PPD aviaire et par la PPD bovine n'étaient pas significativement différentes (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,22$  et  $p = 0,14$ ). Pour le MIX, cette différence était significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,005$ ). Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul (**Annexe XVI**)

Ces résultats n'étaient pas très différents chez les 9 bovins pour lesquels les résultats aux deux IDT étaient identiques (voir le **tableau 15** et la **figure 17** ci-après. Le test de Wilcoxon pour échantillons appariés nous permet de conclure que la médiane de la production d'IFN suite à la stimulation par la PPD bovine n'était pas significativement différente, entre l'IFN1 et l'IFN2 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1$ ). Il en était de même pour le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,10$ ) et pour la PPD aviaire (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,19$ ).

**Tableau 15** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 10 bovins infectés inclus dans le cadre du protocole, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude

	RATIOPPD1	RATIOPPD2	RATIOPPDB1	RATIOPPDB2	RATIOMIX1	RATIOMIX2
1 <sup>er</sup> QUARTILE	0,0375	0,208	0,13	0,12475	0,7707	0,4202
MINIMUM	0,022	0,067	0,018	0,034	0,046	0,174
MEDIANE	0,1485	0,288	0,8215	0,32	0,8265	0,7795
MOYENNE	0,2268	0,444	0,6239	0,366	0,7787	0,830
MAXIMUM	0,605	1,214	1,139	0,883	1,183	1,862
3 <sup>ème</sup> QUARTILE	0,382	0,5	1,034	0,544	0,985	1,114



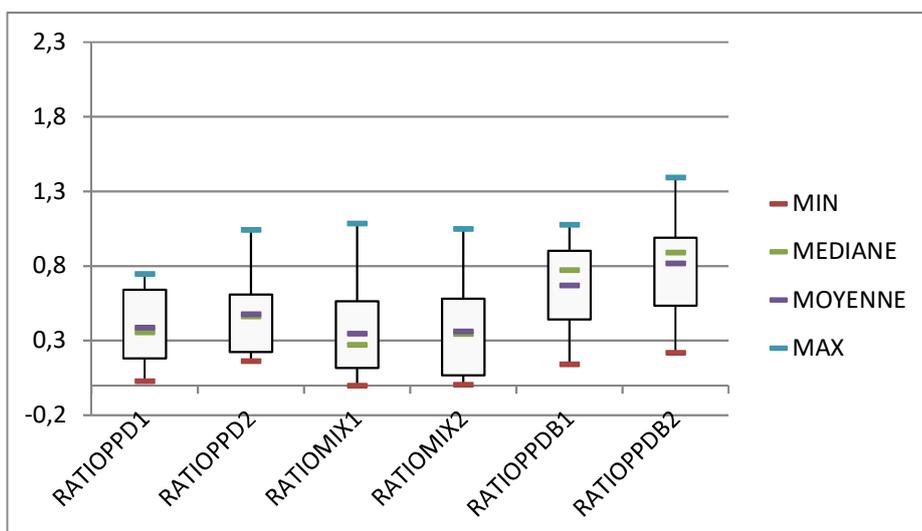
**Figure 17** : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 10 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole et dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude.

#### Animaux inclus dans en SR

Les résultats en termes de ratio de densité optique aux deux IFN des 18 bovins infectés en SR sont présentés dans le **tableau 16** suivant et dans la **figure 18** ci-après.

**Tableau 16** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 18 bovins infectés en SR

	RATIOPPD1	RATIOPPD2	RATIO PPDB1	RATIO PPDB2	RATIO MIX1	RATIO MIX2
1 <sup>er</sup> QUARTILE	0,181	0,2235	0,11675	0,067	0,44275	0,53375
MINIMUM	0,028	0,164	-0,002	0,005	0,143	0,219
MEDIANE	0,357	0,463	0,2735	0,345	0,774	0,892
MOYENNE	0,389	0,479	0,347	0,363	0,670	0,818
MAXIMUM	0,748	1,042	1,085	1,050	1,077	1,395
3 <sup>ème</sup> QUARTILE	0,640	0,607	0,564	0,580	0,902	0,989



**Figure 18** : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production in vitro d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 18 animaux infectés en SR.

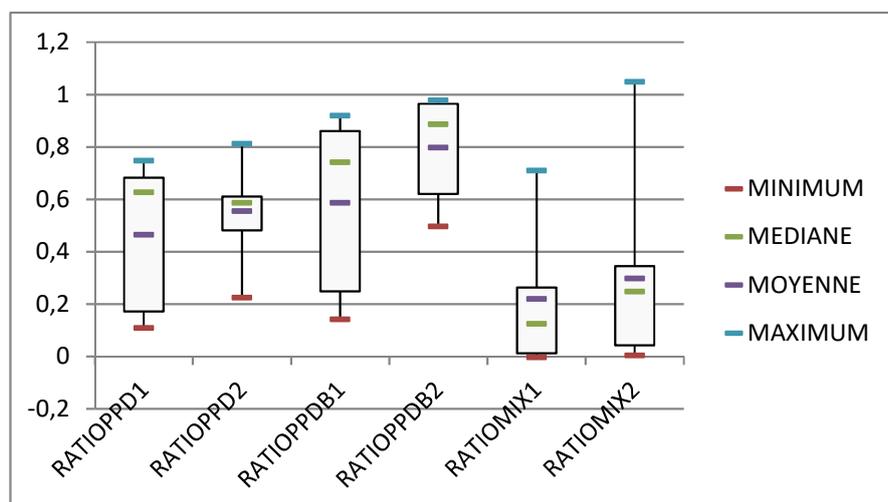
On peut noter une augmentation globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test. Cependant, la médiane de la production d'IFN suite à la stimulation par la PPD aviaire n'était pas significativement différente entre l'IFN1 et l'IFN2 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,22$ ). Il en était de même pour le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,57$ ). En revanche, cette différence était significative suite à la stimulation par PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,04$ ). Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul, sauf pour la PPD bovine qui a fourni un test non significatif (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,10$ ) (**Annexe XVI**)

Pour s'assurer que le statut infectieux évoluait peu, nous avons choisi d'isoler les animaux pour lesquels les résultats aux deux IDT étaient identiques.

Au total, neuf bovins infectés avaient des résultats identiques aux tests cutanés. Leurs résultats sont présentés dans le **tableau 17** suivant et dans la **figure 19** ci-après.

**Tableau 17** : Paramètres statistiques des ratios PPD, PPDB et MIX pour les 9 bovins infectés en SR, dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude

	RATIOPPD1	RATIOPPD2	RATIO PPDB1	RATIO PPDB2	RATIO MIX1	RATIO MIX2
1 <sup>er</sup> QUARTILE	0,172	0,482	0,248	0,62	0,012	0,043
MINIMUM	0,109	0,225	0,143	0,497	-0,002	0,005
MEDIANE	0,628	0,588	0,742	0,888	0,125	0,248
MOYENNE	0,466	0,556	0,588	0,799	0,221	0,299
MAXIMUM	0,748	0,813	0,920	0,979	0,711	1,050
3 <sup>ème</sup> QUARTILE	0,683	0,611	0,861	0,965	0,263	0,345



**Figure 19** : Répartition des valeurs RATIO des densités optiques montrant la production *in vitro* d'interféron en réponse à une stimulation par les PPD aviaire et bovine (PPD), bovine seule (PPDB) et par des antigènes spécifiques (MIX) pour les 9 animaux infectés inclus en SR et dont les résultats d'ID n'ont pas varié au cours de l'étude.

Comme précédemment, on peut noter une augmentation globale des densités optiques entre le premier et le second test (sauf pour le ratio PPD). Cependant, la médiane de la production d'IFN suite à la stimulation par la PPD aviaire n'était pas significativement différente, entre l'IFN1 et l'IFN2 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,49$ ). Il en était de même avec le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,20$ ). Par contre, cette différence était significative pour la PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,04$ ). Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul, sauf pour la PPD bovine qui a fourni un test significatif (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,10$ ) (**Annexe XVI**)

Concernant les animaux indemnes, on a observé une diminution globale des densités optiques entre le premier et le second test. Chez les animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole, la production d'IFN suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,38 \times 10^{-10}$ ), selon l'existence d'une injection préalable (J3) ou non (J42). Il en était de même concernant le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 7,37 \times 10^{-05}$ ). Avec la PPD aviaire en revanche, la différence n'était pas significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,06$ ). La réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42, et ce, dans tous les cas. Par ailleurs, chez les animaux indemnes en SR, la différence était non significative pour la PPD aviaire (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,28$ ). Mais, la production d'interféron suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente entre J3 et J42 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,02 \times 10^{-10}$ ) et il en était de même avec le MIX (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,001$ ).

Pour les animaux infectés inclus dans le cadre du protocole, on peut noter une diminution globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test. Les médianes de la production d'interféron suite à la stimulation par la PPD aviaire et par la PPD bovine n'étaient pas significativement différentes (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,22$  et  $p = 0,14$ ). Pour le MIX, cette différence était significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,005$ ). En revanche, chez les animaux infectés en SR, on a pu noter une augmentation globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test. Cependant, la production d'IFN médiane suite à la stimulation par la PPD aviaire n'était pas significativement différente, entre l'IFN1 et l'IFN2 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,22$ ). Il en était de même pour le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,57$ ). Par contre, cette différence était significative concernant la PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,04$ ).

## IV. Discussion

### 1. Validité interne et externe de l'étude

Le protocole expérimental s'est étendu sur une durée de deux campagnes de prophylaxie consécutives (de 2013 à 2015) pour permettre de collecter suffisamment de données afin de disposer d'une puissance statistique adéquate. Il est néanmoins important de noter que le nombre final d'animaux dont l'infection tuberculeuse a pu être confirmée avec certitude n'est pas très élevé.

L'étude a été menée sur l'ensemble du territoire national continental pour les animaux répondant aux critères d'inclusion. Dix départements ont pu être inclus dans le dispositif à savoir les Ardennes (08), l'Ariège (09), la Charente (16), la Côte-d'Or (21), la Dordogne (24), Lot-et-Garonne (47), les Pyrénées-Atlantiques (64), les Hautes-Pyrénées (65), Tarn (81) et la Haute Vienne (87).

Pour le reste des départements français, la prophylaxie de la tuberculose bovine en élevage a été totalement arrêtée dans 60 départements. Par conséquent, pour ceux-là l'inclusion des animaux dans l'étude était impossible. Par ailleurs, l'incitation des éleveurs à rentrer dans le dispositif expérimental était très variable d'un département à l'autre, selon le contexte (moyens humains disponibles à la DDPP, historique de la tuberculose dans le département, présence ou non d'un laboratoire agréé pour l'IFN à proximité ...) et l'inclusion des animaux dans le protocole expérimental était basée sur le volontariat, on peut donc suspecter que ce type d'inclusion puisse influencer les résultats obtenus. En effet, on peut faire l'hypothèse que les éleveurs sont peut-être rentrés dans le protocole par intérêt en raison d'un faible nombre d'animaux réagissant pour éviter la suspension de qualification, or de tels élevages ont un risque plus faible d'être infectés. De même, on peut faire l'hypothèse que les éleveurs ayant déjà rencontré des problèmes de tuberculose n'adhèrent pas forcément à l'idée d'intégrer le protocole. Cependant, la majeure partie des enregistrements provient de Côte-d'Or et de Dordogne, où le volontariat n'influe pas sur l'intégration des éleveurs dans le protocole.

Concernant les enregistrements inclus dans la base de données, on constate que 97,9 % des enregistrements utilisables (soit 1098/1122) provenaient de deux départements : la Côte-d'Or (21) et la Dordogne (24), car dans ces deux départements, la participation au protocole a été rendue obligatoire par arrêté préfectoral pour les éleveurs qui avaient des résultats non négatifs en IDT. De plus, En Dordogne, il existe le système du suivi renforcé qui engendrait une surreprésentation dans la base. Mais cela ne semble pas poser pas un problème majeur car finalement, sur le terrain, c'est surtout dans ces zones-là que le test IFN est susceptible d'être utilisé en recontrôle, en série après une IDT non négative.

En cas d'abandon ou de non-respect du protocole, la DDPP était en droit de retirer la qualification de l'élevage, l'objectif de cette démarche était surtout d'éviter les perdus de vue, qui entrent dans l'étude et en sortent dès que c'est trop contraignant ou que l'éleveur pressent que les résultats ne lui seront pas très favorables.

Ont été exclus du protocole tous les troupeaux où la contention des bovins n'était pas optimale pour une lecture adéquate des tuberculinations (taureaux de combat par exemple), les troupeaux classés à risque administratif, les élevages dont le vétérinaire sanitaire refuse de suivre la formation relative à la tuberculination ou de se soumettre à des mesures de supervision de la part de la DDecPP et enfin les établissements de quarantaine et de collecte de semence pour les inséminations artificielles. L'inférence est donc impossible à l'ensemble des bovins français. Mais elle paraît tout à fait possible aux bovins des départements les plus concernés par la tuberculose bovine et ayant obtenu des résultats non négatifs à une IDT en prophylaxie, à condition que les méthodes de travail de l'éleveur et du vétérinaire soient satisfaisantes.

Les conditions de réalisation et d'interprétation des tests ont été standardisées par le Laboratoire National de Référence (LNR), pour l'ensemble des laboratoires du réseau - critère qui n'était pas pleinement rempli il y a encore quelques années. Par ailleurs, les tests IFN ont été effectués en aveugle : les laboratoires ne connaissaient pas le détail des résultats aux tests cutanés des bovins dont ils recevaient les prélèvements, puisque ces informations sont « remontées » par deux voies différentes. De plus, les vétérinaires sanitaires devaient suivre une formation relative à la tuberculination à la demande de la DDPP pour permettre une lecture objective et standardisée des mesures des plis de peau. Un point très intéressant puisqu'il était destiné à permettre de limiter les biais de classement, cependant, nous avons constaté que certains vétérinaires ne respectaient pas forcément les règles de la réalisation des tests cutanés notamment en ce qui concerne le délai de 42 jours à respecter entre les deux tests cutanés.

## 2. Caractéristiques des tests de dosage de l'interféron gamma

### 2.1. Spécificité

Les valeurs de spécificité individuelles calculées pour le test IFN étaient de 47,5 % [44,1 % ; 50,9 %] IC 95% au premier test IFN et de 64,5 % [61,1 % ; 67,7 %] IC 95 % au second test. La différence entre ces deux valeurs était significative (test de Mc Nemar,  $p = 7,38 \times 10^{-39}$ ). Ces valeurs obtenues de spécificité, sont plus faibles que celles rapportées par Wood et Jones (2001) qui s'échelonnent entre 85 % et 99,6 % avec une spécificité médiane de 96,6 % ou bien que celles obtenues par De la Rua-Domenech *et al.* (2006) et Vordermeier *et al.* (2008) qui étaient comprises entre 87,7 % et 99,2 %. Néanmoins, il est important de noter que les réactifs utilisés et les modalités d'interprétation du test IFN ne sont pas identiques d'une étude à l'autre.

Après avoir calculé la spécificité des tests IFN séparément chez les animaux en SR et chez les animaux inclus dans le cadre du protocole, nous avons obtenu des estimations significativement plus élevées pour la spécificité de l'IFN2 chez les animaux inclus dans le cadre du protocole (Sp IFN2-protocole = 61,5 % significativement plus élevée que Sp IFN1-protocole = 49,6 %, Test de Mc Nemar :  $p = 2,89 \times 10^{-10}$ ) et des résultats qui n'étaient pas significativement différents pour les animaux en SR (Sp IFN2-SR = 58,3 % et Sp IFN1-SR = 62,5 %, Test de Mc Nemar :  $p = 0.802$ ). Ce constat pourrait orienter vers un éventuel effet stimulateur de la tuberculine injectée à l'IDT1 sur les résultats des tests IFN1 (Wood et Jones, 2001) chez les animaux inclus dans le cadre de protocole (production plus importante de l'interféron chez ces animaux, ce qui implique une augmentation du nombre d'animaux réagissant au test IFN1 et par conséquent, une baisse de la spécificité de ce test). Ce qui n'est pas le cas chez les animaux en SR qui ont reçu l'ID après la prise de sang destinée à l'IFN.

Ces valeurs de spécificité individuelle médiocres voire mauvaises, notamment pour le test IFN1, peuvent en partie être expliquées par l'utilisation actuelle de l'IFN en France. En effet, le test IFN tel qu'il est utilisé en France correspond à une association en parallèle du test Bovigam et des antigènes recombinants, ce qui accroît la sensibilité du test mais dégrade sa spécificité. Il est par ailleurs impératif de tenir compte de ces spécificités basses lorsque l'on travaille à l'échelle du troupeau. En effet, dans un effectif de plusieurs dizaines d'animaux, la spécificité troupeau sera d'autant plus faible que le nombre d'animaux est élevé, ce qui engendre encore une dégradation de la qualité du dépistage dans un effectif indemne (grand nombre de résultats faussement positifs). Néanmoins, si ce test est utilisé en recontrôle sur des lots de quelques animaux, cet effet sera moins important qu'à l'échelle du troupeau entier.

Par ailleurs, les animaux indemnes étaient ceux provenant d'un élevage officiellement indemne (et qui avait conservé sa qualification après la réalisation des tests de dépistage). Cependant, ces animaux provenaient de cheptels en SR pour une grande majorité : il s'agissait donc de cheptels à risque épidémiologique vis-à-vis de la tuberculose. Cette référence « indemne » n'est donc pas parfaite. D'autre part, les animaux inclus sont tous des animaux réagissant à la tuberculination initiale. Ils peuvent donc plus probablement être infectés par des mycobactéries responsables de réactions croisées, à l'intradermotuberculination comme à l'IFN. De plus, la majorité de nos animaux proviennent de Côte d'Or, où on sait qu'on a beaucoup de réactions croisées qui nuisent à la spécificité de l'IDT, mais probablement également en partie aussi à la spécificité de l'IFN.

### 2.2. Sensibilité

Il est avant tout nécessaire de prendre en compte le faible nombre d'animaux infectés étudiés, qui engendre à la fois un manque de précision des valeurs de sensibilités calculées et d'autre part un manque de puissance statistique.

Les valeurs de sensibilités individuelles de l'IFN1 (96,0 % [81,0 % ; 99,0 %] IC 95 %) et de l'IFN2 (100 % [87,0 % ; 100 %] IC 95 %) étaient toutes les deux élevées, ce qui indique une bonne détection des animaux malades. Ces résultats sont proches des valeurs rapportées par la littérature. Wood et Jones (2001) par exemple, décrivent les performances du test Bovigam évaluées dans de nombreux essais (Australie, Brésil, Irlande, Italie, Grande-Bretagne et Etats-Unis) ; la sensibilité variait entre 73 % et 100 % avec une valeur médiane de 87,6 %, De la Rua-Domenech *et al.*, (2006) fournissent des valeurs de sensibilité qui varient entre 80,9 % et 100 %. Les valeurs de sensibilités

calculées chez les animaux inclus dans le protocole seuls n'étaient pas différentes des valeurs calculées dans l'intégralité de l'échantillon des animaux infectés.

Par ailleurs, les sensibilités de l'IFN1 et de l'IFN2 n'étaient pas significativement différentes (*test de Mc Nemar, p= 1*). Ce résultat rejoint ceux de Gormley *et al.*, 2004 et Vordermeier *et al.*, 2004 ou encore de la Rua-Domenech *et al.*, 2006, qui indiquent que la sensibilité du test IFN ne semble pas affectée par la réalisation préalable d'une IDT.

Dans le cadre de cette étude, tout bovin présentant des résultats positifs en PCR et/ou culture (isolement de *M. bovis*) a été considéré comme infecté. Cependant, malgré le fait que l'isolement de *M. bovis* dispose d'une spécificité parfaite (absence des faux positifs), le petit bémol est que cette méthode n'est pas parfaitement sensible et peut conduire à conclure à tort qu'un animal est indemne alors qu'il serait réellement infecté (« faux négatifs »). Par conséquent, en choisissant cette référence on peut passer à côté d'animaux réellement infectés.

Enfin, l'abattage des animaux dépendait de leurs résultats aux 4 tests, or ce sont ces tests que l'on évalue. Ce n'est pas une situation idéale (il faudrait que les critères qui ont conduit à l'abattage et donc à la potentielle mise en évidence de la mycobactérie soient indépendants des tests qu'on a étudiés.

### 2.3. Comparaison avec les tests cutanés

La spécificité individuelle calculée était de 88,6 % [86,3 % ; 96,6 %] IC 95 % pour l'IDT2. Cette valeur était significativement supérieure (*test de Mc Nemar, p = 2,36x10<sup>-61</sup>*) à la spécificité de l'IFN1 qui était de 47,5 % [44,1% ; 50,9%] IC 95 %, ce qui est conforme à la littérature (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Bezos *et al.*, 2014) qui montre une spécificité plus faible des tests IFN que des IDT. Les valeurs de la spécificité individuelle calculées séparément chez les animaux indemnes ayant reçu une IDS à l'IDT1 et ceux ayant reçu une IDC à l'IDT1, n'étaient pas significativement différentes de celles calculées précédemment, et le test intradermique était toujours plus spécifique que les tests de dosage de l'interféron quelle que soit la technique utilisée à l'occasion de l'IDT1.

Les mêmes constats étaient faits chez les animaux inclus dans le cadre du protocole et chez les animaux en SR, ce qui signifie que le test de dosage de l'interféron est toujours moins spécifique que les tests intradermiques, qu'une injection préalable de tuberculine ait été réalisée ou non. Par ailleurs, il a été rapporté par Coad *et al.* (2007) ainsi que Schiller *et al.* (2010) l'absence d'influence d'une IDT sur les résultats de dosage de l'IFN.

La sensibilité individuelle calculée pour l'IDT2 était de 50,0 % [32,0 % ; 68,0 %] IC 95%. Cette sensibilité était significativement (*test de Mc Nemar, p = 0,003*) inférieure à la sensibilité de l'IFN1 qui était de 100 % [87,0 % ; 100 %] IC 95 %, ce qui est conforme à la littérature (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Bezos *et al.*, 2014) qui parle d'une supériorité de la sensibilité des tests IFN. Néanmoins, la valeur de sensibilité calculée dans notre étude est anormalement basse par rapport aux estimations fournies dans la littérature. Ceci peut être expliqué par deux phénomènes. Tout d'abord, comme expliqué précédemment, les caractéristiques des tests ont été estimés chez des animaux ayant obtenu des résultats non négatifs à une première IDT, à l'exception des animaux qui avaient subi une IDC en première intention et qui avaient obtenu un résultat positif à cette IDC. Ces animaux ont été abattus immédiatement après la réalisation de l'IFN1, sans attendre le recontrôle à 42 jours : les animaux les plus fortement réagissant en ID ont donc été éliminés de l'échantillon. Il est également important de prendre en compte le fait que, dans notre étude, le délai moyen entre les deux IDT était de 42 jours, mais que pour un nombre non négligeable d'animaux infectés, il était inférieur à 42 jours, ce qui induit une désensibilisation des animaux et donc une moindre réactivité à l'IDT2. Ceci engendre une diminution de la sensibilité de l'IDT2.

Des résultats similaires ont été observés en séparant les animaux inclus dans le protocole de ceux en SR. Gormley *et al.*, 2001 et Vordermeier *et al.*, 2004 ont rapporté que la sensibilité du test IFN ne semble pas affectée par la réalisation préalable d'une IDT, ce qui vient appuyer les résultats obtenus par notre étude.

Enfin, cette sensibilité élevée de l'IFN1 sera encore plus élevée si l'on travaille à l'échelle du troupeau, étant donné qu'un seul animal à résultat non négatif à l'un des tests de dépistage suffit pour placer son élevage sous suspicion (Toma *et al.*, 2010). Néanmoins, ce phénomène est probablement limité dans le cas de notre étude en raison du fait que le nombre d'animaux dont l'infection est confirmée au sein d'un

foyer est fréquemment faible (de l'ordre de une à trois bêtes), et que le test IFN tel qu'il est évalué dans notre étude, est destiné à être utilisé sur des nombres d'animaux restreints (lots) et non à l'échelle d'un cheptel entier, surtout étant donné le prix du test IFN par animal (de l'ordre de 40 à 60 euros).

### **3. Etude de l'effet d'une injection de tuberculine sur les résultats d'un test de dosage de l'interféron gamma effectué 3 à 8 jours plus tard : approche qualitative**

Pour l'étude des combinaisons de résultats des animaux indemnes, seuls les animaux ayant des réactions identiques aux tests cutanés ont été conservés afin de limiter l'effet des variations d'immunité entre les deux tests ainsi que des infections transitoires par des *Mycobactéries*.

En observant les combinaisons de résultats des animaux indemnes et en dénombrant les animaux dans chaque catégorie, nous avons constaté que chez les animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole, il n'y avait pas de différence significative entre les pourcentages des animaux réagissant au premier et au second test d'IFN. Les animaux indemnes entrés dans le protocole semblaient donc réagir de manière équivalente aux deux tests IFN, ce qui implique que la tuberculination préalable ne semble pas influencer sur le test de dosage d'IFN (Schiller *et al.*, 2010b). Par ailleurs, les analyses faites sur les animaux indemnes ayant reçu une IDS lors du premier test d'IDT ne montrent aucun effet de l'injection de tuberculine sur les résultats des tests IFN. Il en est de même pour les animaux indemnes ayant subi une IDC lors de l'IDT1. Il est néanmoins nécessaire de prendre en compte le fait que les effectifs des deux échantillons sont faibles ce qui engendre un manque de puissance statistique.

Cependant, l'analyse des résultats du Bovigam seul (recommandations de l'UE) a montré qu'il y avait significativement plus d'animaux réagissant au premier test d'IFN qu'au second. Les animaux indemnes entrés dans le protocole semblent donc avoir une réponse plus importante au premier test IFN, dont le résultat pourrait être influencé par l'injection de tuberculine lors du premier test cutané (effet « booster »). (Wood et Jones, 2001)

Concernant les animaux indemnes inclus en suivi renforcé, les animaux étaient plus fréquemment réagissant à l'IFN1 qu'à l'IFN2. Ce même constat a été fait en utilisant le Bovigam seul ou IFN global (Bovigam combiné avec le MIX). L'absence d'une injection au préalable de tuberculine qui pourrait expliquer cette augmentation de la réponse au premier test d'IFN nuance l'interprétation de l'influence de la tuberculination sur les résultats d'IFN chez les animaux entrés dans le protocole. S'ajoutant à cela, plusieurs facteurs pouvant expliquer le nombre important de faux positifs aux tests d'interféron comme le type d'élevage et le type de logement (Cagiola *et al.*, 2004). Par ailleurs, le test IFN est décrit comme plus précoce que l'IDT (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006 et Bezos *et al.*, 2014) ; on peut imaginer qu'une réaction non spécifique engendre une réponse précoce à l'IFN, qui soit moins durable que la réponse en IDT.

Pour les animaux infectés, compte tenu des faibles effectifs, l'interprétation des combinaisons est délicate. En effet, il faudrait appliquer le même raisonnement que précédemment et n'utiliser que les animaux qui ont le même résultat aux deux IDT. Or cela ne concerne plus que 10 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole (neuf animaux ont obtenu des réponses positives aux tests IFN et un seul animal qui s'est vu positif à l'occasion de l'IFN2) et neuf animaux en SR qui ont tous obtenu des résultats positifs aux deux tests de dosage de l'interféron.

Néanmoins, nous étions dans le cas d'animaux qui ont été reconnus infectés par *Mycobacterium bovis*, une infection chronique. De plus, pendant la période de l'étude relativement courte, il n'était pas censé y avoir des mouvements importants des animaux (conditions d'inclusion dans le protocole), on pouvait donc considérer qu'*a priori* leurs statuts infectieux ne variaient pas ou peu entre les deux tests IFN.

Les analyses brutes, c'est-à-dire sans isoler les animaux dont les résultats aux deux tests cutanés étaient identiques, montraient que 20 animaux sur les 21 inclus dans le cadre du protocole avaient des résultats aux deux tests interféron identiques et que tous les animaux infectés inclus en SR (18) avaient des résultats identiques. Cela suggère une absence d'effet de l'injection de tuberculine sur le résultat IFN des animaux infectés. Plusieurs auteurs ont obtenu ce résultat (Gormley *et al.*, 2004 et de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Ce même constat a été fait en utilisant le Bovigam seul ou Bovigam global (Bovigam combiné avec le MIX)

En résumé, l'analyse de la partie "approche qualitative" de notre étude nous permet de conclure que pour les animaux indemnes, l'utilisation du test Bovigam seul (sans l'associer au MIX) semble avoir effet stimulateur sur les résultats des tests d'interféron à J3 (il y avait plus d'animaux réagissant à l'IFN1 précédé par une injection de tuberculine qu'à l'IFN2). Néanmoins cette observation est nuancée par le fait que, pour tous les animaux indemnes (en SR comme dans le protocole), la réponse IFN était plus élevée lors du test réalisé à J3 qu'à J42, que le test ait été précédé d'une injection de tuberculine ou non. Ceci peut être mis en lien avec l'existence de réactions croisées. Par ailleurs, l'utilisation du test Bovigam associé au MIX (protéines recombinées) ne montre aucun effet sur les résultats des tests d'interféron à J3 (il n'y avait pas de différence significative entre le pourcentage des animaux réagissant à l'IFN1 et celui des animaux réagissant à l'IFN2).

Pour les animaux infectés, et on se basant sur les analyses brutes, c'est-à-dire sans isoler les animaux dont les résultats aux deux tests cutanés étaient identiques, nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre le nombre des animaux réagissant à l'IFN réalisé à J3 (avec une injection préalable de tuberculine) et celui des animaux réagissant à l'IFN réalisé à J42. Cela suggère une absence d'effet de l'injection de tuberculine sur le résultat IFN des animaux infectés. Plusieurs auteurs ont obtenu ce résultat (Gormley *et al.*, 2004 et de la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

#### **4. Etude de l'effet d'une injection de tuberculine sur les résultats d'un test de dosage de l'interféron gamma effectué 3 à 8 jours plus tard : approche quantitative**

Dans un second temps, l'effet de l'injection de tuberculine sur les résultats quantitatifs de l'IFN (ratios PPD, PPDB et MIX) a été étudié.

Pour les animaux indemnes inclus dans le protocole, les effectifs étudiés étaient de grande taille et les différences entre les médianes des ratios des densités optiques avant et après injection de tuberculine n'étaient pas significatives concernant la PPD aviaire (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,06$ ). En revanche, la différence était significative pour le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 7,37 \times 10^{-05}$ ) et il en était de même pour la PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,38 \times 10^{-10}$ ). Les réponses IFN étaient plus importantes lorsque la prise de sang était réalisée quelques jours après l'injection de tuberculine qui correspondait au premier test cutané. Ainsi, on pourrait supposer que l'injection de tuberculine lors des tests cutanés a un effet stimulateur sur le résultat à l'interféron. Ce même constat a été fait en utilisant le Bovigam seul ou l'IFN global (Bovigam combiné avec le MIX), en effet, La réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42, et ce, dans tous les cas.

Par ailleurs, les résultats obtenus en séparant les animaux selon la nature de l'IDT1 étaient très similaires à ceux obtenus en les regroupant. La réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42, et ce, dans tous les cas.

Concernant les animaux indemnes en SR, les différences entre les médianes des ratios des densités optiques étaient significatives pour la PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,02 \times 10^{-10}$ ) et le MIX (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,001$ ), mais pas pour la PPD aviaire (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,28$ ). Ce même constat a été fait en utilisant le Bovigam seul ou l'IFN global (Bovigam combiné avec le MIX). Cette observation tend à nuancer l'observation précédente puisqu'aucune injection de tuberculine n'a ici pu engendrer une augmentation de la réponse à l'IFN1. Par ailleurs, chez les animaux indemnes, seuls les animaux ayant obtenu des résultats identiques aux deux IDT ont été étudiés. Leur statut immunitaire vis-à-vis de mycobactéries responsables de réactions croisées est donc théoriquement stable. Néanmoins, le test IFN est décrit comme plus précoce que l'IDT : on peut imaginer qu'une réaction non spécifique engendre une réponse précoce à l'IFN, qui soit moins durable que la réponse en IDT.

Pour les animaux infectés et comme pour les analyses qualitatives, il faudrait n'utiliser que les animaux qui ont le même résultat aux deux IDT. Cela ne concerne que 10 animaux infectés inclus dans le cadre du protocole et neuf animaux en SR, raison pour laquelle, les analyses ont été réalisées sans sélectionner les animaux dont les résultats aux tests intradermiques étaient identiques.

Les analyses ne montrent, chez les animaux infectés inclus dans le protocole, aucune différence significative entre les médianes des ratios des densités optiques en réponse aux PPD bovine et aviaire (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,22$  et  $p = 0,14$ ) à J3-8 et à J42. Des résultats similaires chez des animaux infectés ont été rapportés par Doherty en 1995, qui avait démontré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les moyennes de densités optiques. C'est aussi la conclusion tirée d'une autre étude un peu plus récente, celle de Gormley *et al.* (2004) qui avaient comparé les résultats à l'interféron à J0, J3 et J10 après une injection de tuberculine sans observer de différences significatives dans les résultats de l'interféron.

Cette observation peut aller dans le sens de l'hypothèse selon laquelle l'injection de tuberculine n'aurait aucun effet (stimulateur ou inhibiteur) sur le résultat du test IFN chez les animaux infectés. Cela pourrait se confirmer par les analyses réalisées chez les animaux en SR, chez lesquels aucune différence significative entre les médianes des ratios des densités optiques en réponse à la stimulation par le MIX ou PPD aviaires n'a été mise en évidence et ce, en l'absence de tuberculine injectée au préalable. Cette différence était en revanche significative suite à la stimulation par PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,04$ ), ce qui pourrait s'expliquer par des réactions atypiques.

**En résumé, l'analyse de la partie "approche quantitative" de notre étude nous permet de conclure que pour les animaux indemnes, l'injection de la tuberculine à l'occasion de l'IDT1 (à J0) pourrait avoir un effet stimulateur sur les résultats des tests d'interféron à J3. En effet, il y avait une modification dans les valeurs des densités optiques entre les deux tests IFN à J3 et J42. Néanmoins, une diminution des densités optiques (PPD bovine et MIX) entre IFN1 et IFN2 a également été mise en évidence chez les animaux en SR, sans que cela soit imputable à une injection de tuberculine. Il est possible que la plus forte réponse à l'IFN1 soit due à une réaction croisée précoce en IFN et moins durable qu'en IDT.**

**Pour les animaux infectés, nous avons montré qu'il n'y avait pas de modifications dans les valeurs de densité optique entre les deux tests IFN à J3 et J42. L'injection de tuberculine ne semble donc pas agir sur le résultat du test IFN trois jours après le test cutané. C'est aussi la conclusion tirée d'autres études, notamment celle de Gormley *et al.* (2004) qui avaient comparé les résultats à l'interféron à J0, J3 et J10 après une injection de tuberculine sans observer de différences significatives dans les résultats de l'interféron.**

## **5. Vers une utilisation du test IFN en recontrôle suite à une IDT non négative sur le terrain ?**

Au final, notre étude nous a permis de conclure que le test IFN1 est plus sensible que l'IDT de recontrôle ce qui signifie, *a priori*, qu'il n'y a pas de risque de sous-détection des animaux atteints de tuberculose, et donc pas de risque pour le commerce des bovins, notamment au niveau de l'union européenne. Nous avons également pu mettre en évidence qu'il n'y avait pas d'effet désensibilisant de la tuberculine injectée lors de l'IDT1 sur les résultats de l'IFN1 réalisé quelques jours après, ce qui pourrait faire du test IFN une alternative permettant de s'affranchir du délai d'attente de six semaines qu'il faut respecter entre deux IDT lorsque la première IDT s'avère non-négative.

Cependant, la spécificité de l'IFN1 est médiocre, ce qui augmenterait les risques de résultats faussement positifs. Si ce protocole IDT-IFN est accepté par l'UE, il faudrait donc le réserver à certains types d'élevages, pour lesquels le blocage de 42 jours engendre un impact économique tel qu'il serait préférable de retester par l'IFN sans attendre, quitte à augmenter le nombre d'abattages diagnostiques.

Enfin, l'étude des résultats quantitatifs et qualitatifs de l'IFN réalisé avant ou après injection de tuberculine suggère l'existence d'un effet stimulateur de l'injection de tuberculine sur le résultat de l'IFN chez les animaux indemnes, lorsqu'on observe les ratios de densité optique ou lorsque le résultat de l'IFN est interprété sur la seule base du Bovigam. Cet effet tend en revanche à être gommé lorsque les résultats de l'IFN sont interprétés en prenant en compte le MIX, ce qui montre l'intérêt de conserver l'usage du MIX et du Bovigam pour l'interprétation du résultat IFN. Précisons enfin qu'un lien de causalité entre injection de tuberculine et augmentation de la réponse IFN chez les animaux indemnes ne pourrait être vérifié rigoureusement qu'en contrôlant strictement les autres facteurs intercurrents entrant en jeu, ce qui n'a pas pu être réalisé dans notre étude. Des investigations complémentaires conduites en laboratoire pourraient permettre de corroborer et d'approfondir nos observations.

# Conclusion

Bien que reconnue indemne de tuberculose bovine depuis 2000, la France n'est toujours pas parvenue à éradiquer cette maladie de son territoire national, malgré les mesures de prophylaxie et les contrôles à l'introduction. La tuberculose bovine se traduit par une grande diversité de signes cliniques rendant un diagnostic clinique très difficile, ce qui fait d'elle une maladie complexe à éradiquer. La lutte contre cette maladie est fondée principalement sur le dépistage. Les seules techniques reconnues réglementairement au sein de l'Union Européenne sont les tests cutanés, mais ils présentent des imperfections quant à leurs caractéristiques intrinsèques et à leur réalisation. De même, les protocoles actuels imposent des blocages d'élevages en cas de troupeaux suspects. D'où l'intérêt de nouveaux tests tels que le dosage de l'interféron.

Le protocole expérimental mis en place lors de deux campagnes de prophylaxie (2013-2014 et 2014-2015) vise à améliorer le diagnostic et à réduire les contraintes évoquées en étudiant la possibilité de remplacer l'IDC réalisée 42 jours (IDT de recontrôle) suite à l'obtention d'un résultat non négatif à l'IDS (IDT réalisée à J0) par un dosage d'interféron gamma (IFN) juste après la lecture de l'IDS. Ce protocole avait deux buts distincts : (i) étudier si ce dosage de l'IFN pratiqué le jour de la lecture des résultats de l'IDS (J3) est au moins aussi sensible que l'IDC de recontrôle à J42 recommandée par la réglementation européenne (Directive CE 64/432). (ii) déterminer si l'injection de tuberculine réalisée à J0 influe ou non sur le résultat du test IFN réalisé à J3, ce qui constitue l'objectif majeur de notre travail de stage.

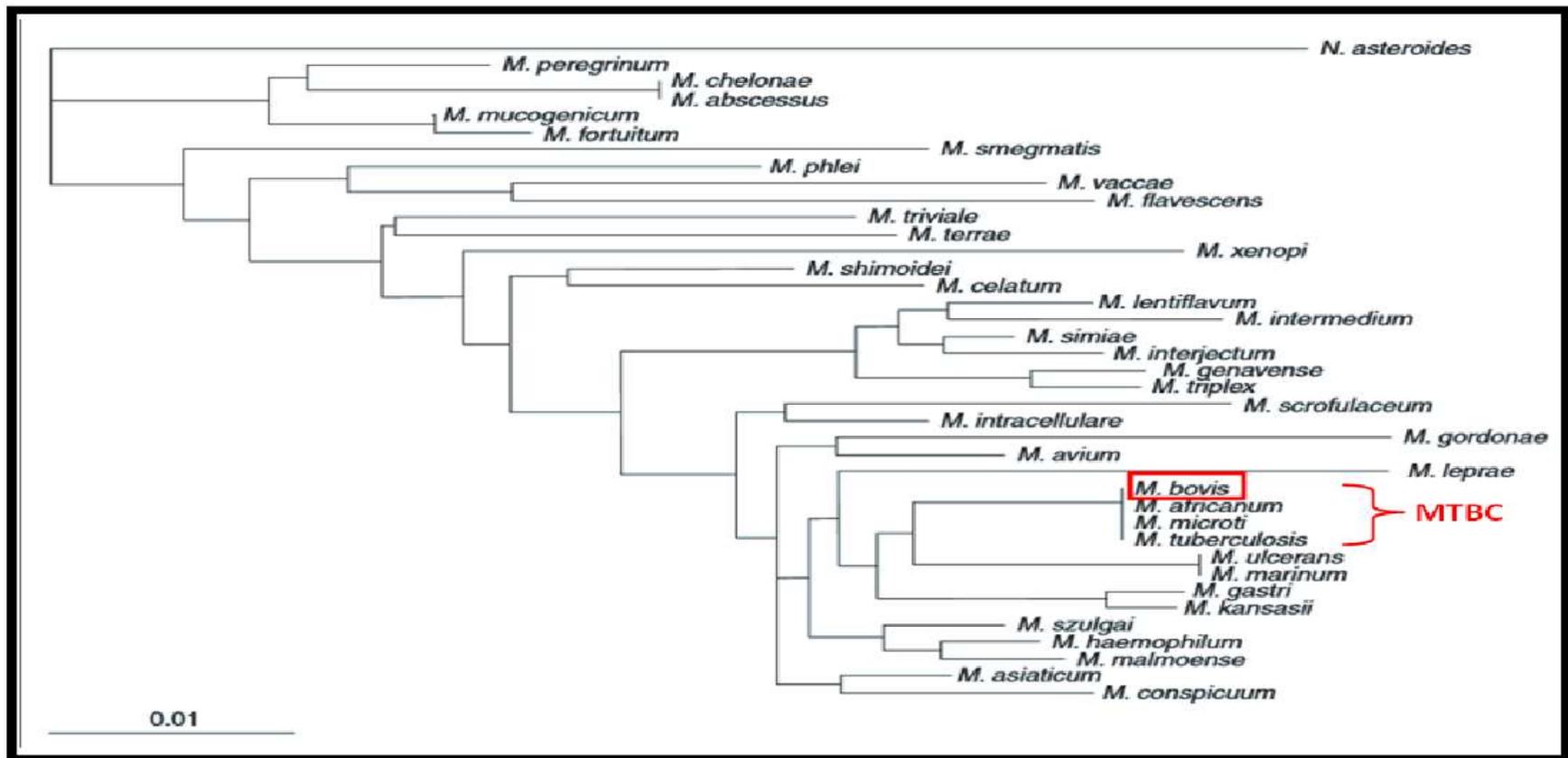
Dans un premier temps, nous avons évalué les caractéristiques du test interféron dans le cadre du protocole et nous avons observé que ce test était plus sensible que les tests cutanés appliqués actuellement lors du recontrôle 42 jours après le premier test. Mais la spécificité était beaucoup moins bonne. Par la suite, nous avons pu vérifier que ce test interféron n'était pas influencé par l'injection de tuberculine réalisée lors du premier test cutané chez les animaux infectés. Mais nous avons par ailleurs démontré potentiellement qu'il pouvait y avoir un effet stimulant de l'injection de tuberculine sur le résultat de l'interféron chez les animaux indemnes.

Par ailleurs, on n'a pas montré d'effet inhibiteur de la tuberculination sur le résultat d'IFN, et donc le protocole associant les deux tests IDT-IFN en série ne semble pas engendrer de sur-risque pour le commerce international.

Il apparaît donc possible, voire intéressant de valider ce protocole expérimental quant à son but premier, une meilleure détection des bovins atteints de tuberculose bovine et par conséquent, la suppression du blocage des cheptels en cas de suspicion de tuberculose notamment chez des élevages, pour lesquels le blocage de 42 jours engendre un impact économique tel qu'il serait préférable de retester par IFN sans attendre, quitte à augmenter le nombre d'abattages diagnostiques à cause de sa spécificité médiocre.

# ANNEXES

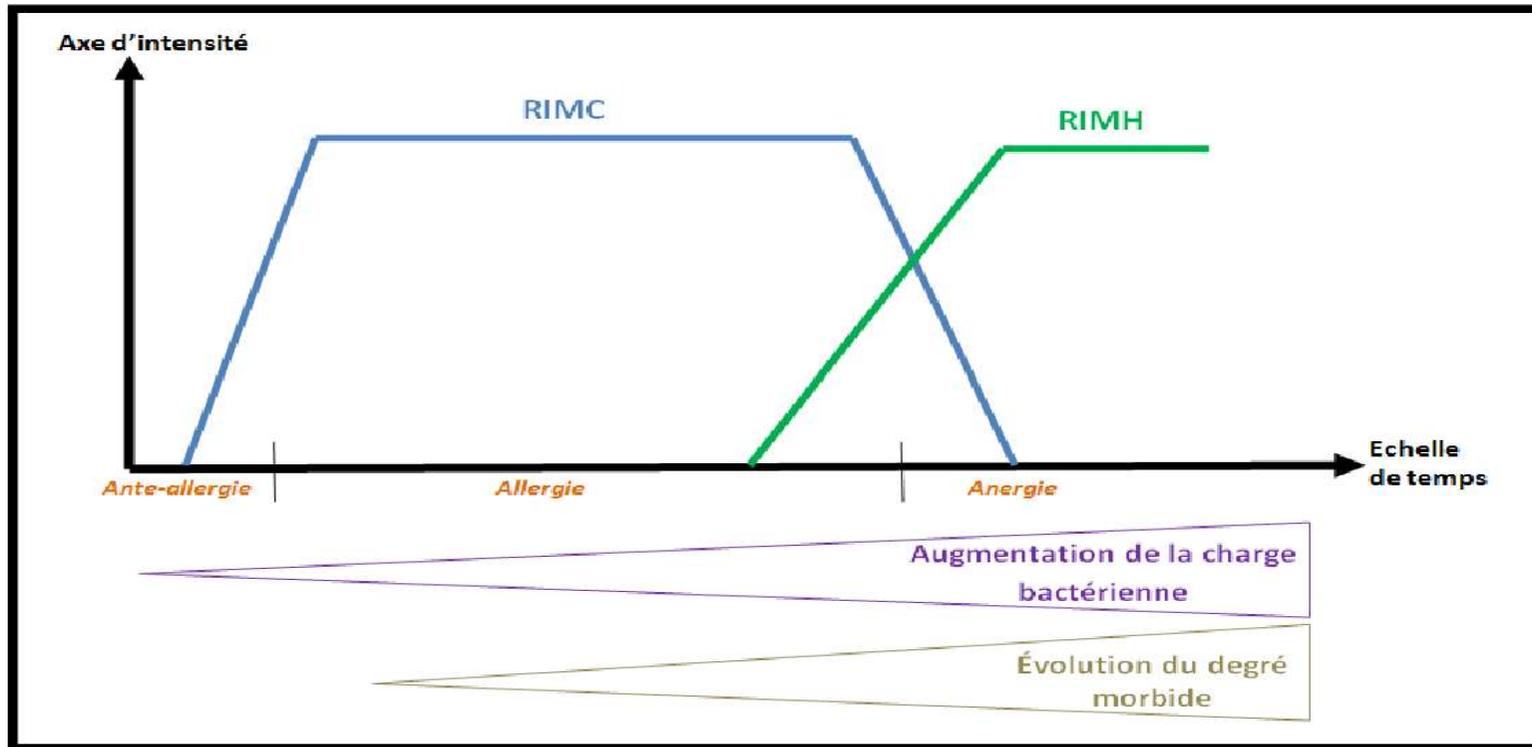
Annexe I : Arbre illustrant la phylogénie des mycobactéries, basée sur l'alignement multiple des séquences des gènes *rrs* (gènes ribosomaux) des principales mycobactéries (échelle longitudinale 0,01 correspond à 1 % de variation entre les différentes séquences nucléotidiques analysées dans l'étude) (Cattoir, 2004).



**Annexe II : Différentes mycobactéries pathogènes du complexe MTC (Rodriguez et al., 2014).**

Espèce du complexe MTC	Pouvoir pathogène	Pouvoir zoonotique
<b><i>M. bovis</i></b>	Tous les Bovidés domestiques peuvent être atteints mais également les bisons, les buffles, les antilopes, les chamois, les camélidés, les chevaux, chiens, chats, et d'autres espèces tels que les lions, primates, etc... Principal agent de la tuberculose bovine rencontré en France et contre lequel la lutte est organisée.	Une contamination de l'Homme est possible notamment par le lait.
<b><i>M. tuberculosis</i></b>	Les Hommes sont les premiers concernés mais également d'autres Mammifères (isolés sur bovins, chèvres, porcs domestiques, chats, chiens) ainsi que des oiseaux peuvent être touchés	Il s'agit de la principale cause de la tuberculose humaine : 12 millions de cas en 2011 selon l'OMS.
<b><i>M. caprae</i></b>	Principal agent étiologique de la tuberculose caprine, les bovins, les cochons domestiques ainsi que des espèces sauvages comme le dromadaire, le chameau ou le bison y sont également sensible.	<i>A priori</i> , il n'y a pas de pouvoir zoonotique démontré.
<b><i>M. canettii</i></b>	Uniquement isolé chez l'Homme. Néanmoins, un réservoir naturel est suspecté.	Cette maladie est émergente dans la corne de l'Afrique.
<b><i>M. orygis</i></b>	Touche principalement l'oryx et l'antilope sing-sing	<i>A priori</i> , il n'y a pas de pouvoir zoonotique démontré.
<b><i>M. mungi (Dassiebacillus)</i></b>	Isolée sur un suricate dans un zoo suédois et sur un daman du cap dans un zoo sud-africain.	<i>A priori</i> , il n'y a pas de pouvoir zoonotique démontré.
<b><i>M. microti</i></b>	Principalement des petits Mammifères peuvent être atteints, mais aussi le chat, le chien, le lama et l'homme.	Utilisée en tant que vaccin contre la tuberculose humaine au Royaume-Uni dans les années 50. Actuellement, on la tient responsable d'infections chez des immunodéprimés en Europe.
<b><i>M. pinnipedii</i></b>	Concerne des Mammifères marins comme le lion de mer australien, ainsi que des otaries australiennes, néo-zélandaises et sud-américaines. Touche également d'autres espèces terrestres comme le tapir, le chameau, ...	Un pouvoir zoonotique a été démontré sur des soigneurs qui s'occupaient d'otaries contaminées dans un zoo australien.
<b><i>M. africanum</i></b>	Atteint l'Homme surtout mais également les Primates et la vache.	Pouvoir zoonotique très fort. Il s'agit de la cause de tuberculose de la moitié des cas en Afrique de l'Ouest. Elle a également été isolée sur des patients en Europe et aux Etats-Unis.
<b><i>M. bovis (BCG)</i></b>	Pas de pouvoir pathogène : souche vaccinale modifiée	

**Annexe III : Évolution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (RIMC) et de la réponse immunitaire à médiation humorale (RIMH) en fonction du temps au cours d'une infection par *M. bovis* (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006).**



**Annexe IV : Exemples de lésions tuberculeuses macroscopiques et microscopiques chez des bovins (service d'histopathologie et d'anatomopathologie de VetagroSup, BELLI P.)**

**1. Lésions macroscopiques**



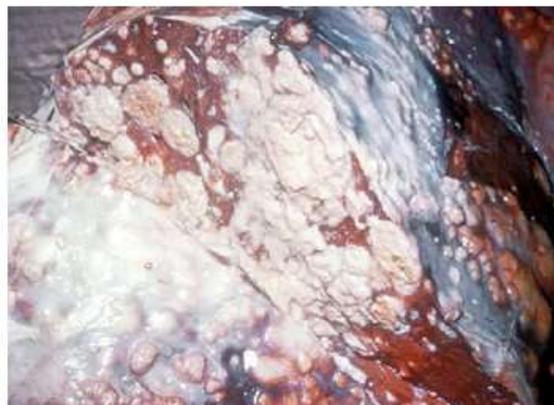
**Animal cachectique**



**Abcès caséeux du ganglion rétro-pharyngé**

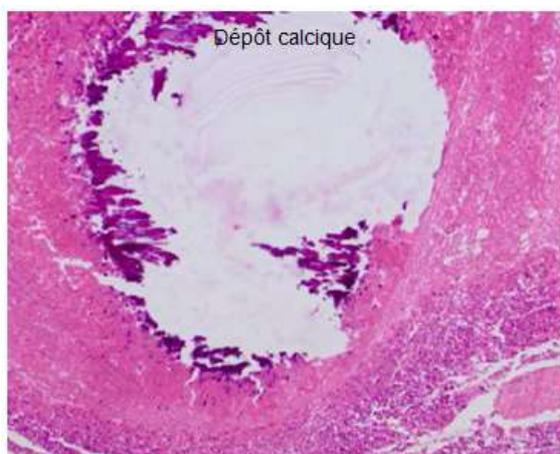


**Abcès caséeux pulmonaires**

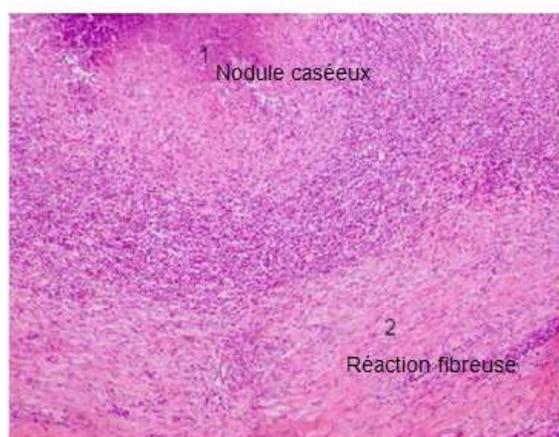


**Abcès caséeux hépatique**

**2. Lésions microscopiques**



**Coupe histologique d'un noeud lymphatique de bovin tuberculeux et visualisation d'un tubercule caséo-calcaire (HE x 200)**



**Coupe histologique d'un nœud lymphatique de bovin tuberculeux et visualisation d'un nodule caséeux (HE x 100)**

**Annexe V : Extraits de l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 modifié le 2 septembre 2014  
(1/2)**

ARRETE

**Arrêté du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins**

NOR: AGRG0301884A

Le ministre de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales,  
Vu la directive 64/432/CEE du Conseil du 26 juin 1964 relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine ;  
Vu la directive 92/46/CEE du Conseil du 16 juin 1992 arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait ;  
Vu l'article L. 2212-2 du code général des collectivités territoriales ;  
Vu le livre II du code rural, et notamment ses articles L. 221-1, L. 223-1 à L. 223-8, L. 224-1 à L. 224-3, L. 231-1, R. 213-1 à R. 213-9, R. 221-9, R. 221-10, R. 223-3 à R. 223-8, R. 223-21, R. 223-22, R. 223-115, R. 223-116, R. 224-1 à R. 224-16, R. 224-47 à R. 224-65, R. 231-12, R. 231-16 et R. 231-18 ;  
Vu le décret n° 55-771 du 21 mai 1955 relatif aux laits destinés à la consommation humaine ;  
Vu l'arrêté du 28 février 1957 relatif à la désinfection dans les cas de maladies contagieuses ;  
Vu l'arrêté du 11 juillet 1990 fixant les mesures techniques relatives à la recherche de la tuberculose bovine en vue des opérations de réhabilitation ;  
Vu l'arrêté du 18 mars 1994 relatif à l'hygiène de la production et de la collecte du lait ;  
Vu l'arrêté du 8 août 1995 fixant les conditions sanitaires relatives à la détention, à la mise en circulation et à la commercialisation des animaux de l'espèce bovine ;  
Vu l'arrêté du 19 octobre 1999 fixant les conditions d'agrément des laboratoires chargés d'effectuer les épreuves de diagnostic des tuberculoses animales ;  
Vu l'arrêté du 1er octobre 2001 fixant les modalités de maintien de qualification des cheptels bovins au regard de la tuberculose et de la brucellose dans certains départements ;  
Vu l'arrêté du 13 mars 2003 pris pour l'application de l'article L. 221-1 du code rural ;  
Vu l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;  
Vu l'avis de la Commission nationale vétérinaire (comité consultatif de la santé et de la protection animales),

**Article 6**

Modifié par ARRÊTÉ du 18 août 2014 - art. 1

Le préfet, sur proposition du directeur départemental en charge de la protection des populations et après accord du ministre chargé de l'agriculture (sous-direction de la santé et de la protection animales), peut prendre toutes dispositions complémentaires aux mesures définies dans le présent arrêté afin de rendre plus efficiente la protection des élevages et de la santé publique à l'égard de la tuberculose. Il prescrit des mesures renforcées de surveillance notamment vis-à-vis des troupeaux présentant un risque sanitaire particulier à l'égard de la tuberculose soit en raison d'un risque d'exposition accru, soit en raison d'un risque particulier pour la santé publique ou la santé animale.

Dans ces troupeaux, il peut prescrire un rythme de dépistage supérieur à celui des autres troupeaux du département et des obligations de dépistage lors du mouvement des animaux.

Il peut également demander un dépistage des animaux d'autres espèces sensibles à la tuberculose détenus de façon non distincte du troupeau de bovinés.

Sont susceptibles de présenter un risque sanitaire particulier à l'égard de la tuberculose :

- a) Les troupeaux ayant retrouvé leur qualification après avoir été reconnus atteints de tuberculose pendant une durée maximale de dix ans ;
- b) Les troupeaux pour lesquels un lien épidémiologique à risque a été constaté avec un animal ou un troupeau atteint de tuberculose ;
- c) Les troupeaux pour lesquels un lien épidémiologique à risque est constaté avec un foyer confirmé de tuberculose dans la faune sauvage ;
- d) Les troupeaux pour lesquels il est établi que des dispositions réglementaires relatives à l'identification ou à la circulation des animaux ou aux conditions de maintien de la qualification " officiellement indemne " de tuberculose n'ont pas été respectées ;
- e) Les troupeaux livrant directement au consommateur du lait cru ou des produits au lait cru ;
- f) Les troupeaux fournissant des animaux participant à la monte publique naturelle ou artificielle ;
- g) Les troupeaux présentés au public.

## **Annexe V : Extraits de l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 modifié le 2 septembre 2014 (2/2)**

### **Article 23**

Modifié par ARRÊTÉ du 18 août 2014 - art. 1

Les troupeaux suspects d'être infectés au sens de l'article 21 sont placés sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance. Leur qualification est alors suspendue.

L'arrêté préfectoral de surveillance prescrit les mesures prévues aux 1°, 2°, 6° et 7° de l'article 26 ainsi que :

1° Mise en œuvre de toutes les investigations épidémiologiques et analytiques, contrôles documentaires, contrôles par intradermotuberculination et éventuellement par test de dosage de l'interféron gamma ou de la mise en œuvre d'une méthode reconnue par le ministère en charge de l'agriculture conformément à l'article 8 de tout ou partie des animaux et contrôles des pratiques d'élevage utiles à la détermination du statut sanitaire du troupeau ;

2° Mise en œuvre des mesures de gestion du lait et des produits laitiers prescrites au point I du chapitre Ier de la section IX de l'annexe III du règlement 853/2004 susvisé.

Lorsque les résultats d'intradermotuberculination et des analyses de laboratoire ne permettent pas d'infirmer la suspicion, le directeur départemental en charge de la protection des populations peut ordonner l'abattage diagnostique d'animaux suspects ainsi que l'autopsie d'animaux morts ou euthanasiés à des fins d'examen nécropsique et de diagnostic expérimental.

Un troupeau recouvre sa qualification si les résultats des contrôles par intradermotuberculination, des investigations épidémiologiques et des analyses de laboratoire prévus ci-dessus sont considérés comme favorables ; en cas de conclusion défavorable, le troupeau est déclaré infecté et les mesures prévues à l'article 26 ci-dessous sont mises en œuvre sans délai.

Une instruction du ministre chargé de l'agriculture précise les conditions d'application des dispositions du présent article en fonction des éléments épidémiologiques recueillis.

### **Article 24**

Modifié par ARRÊTÉ du 18 août 2014 - art. 1

Les troupeaux susceptibles d'être infectés au sens de l'article 21 ci-dessus sont placés sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance et, s'il y a lieu, leur qualification est immédiatement suspendue.

Les investigations prévues à l'article 23 sont diligentées dans ces troupeaux. A ce titre, le directeur départemental en charge de la protection des populations peut ordonner l'abattage diagnostique des animaux en lien épidémiologique avec un troupeau dont l'infection tuberculeuse a été confirmée, et notamment des bovinés issus du troupeau reconnu infecté.

## **Section 1 : Définitions relatives aux animaux et aux troupeaux des espèces de bovinés d'élevage.**

### **Article 12**

Modifié par ARRÊTÉ du 2 septembre 2014 - art. 1

Pour l'application du présent arrêté, les bovinés sont considérés comme :

1° Indemnes de tuberculose lorsqu'ils appartiennent à un troupeau officiellement indemne de tuberculose tel que défini à l'article 13 du présent arrêté ;

2° Suspects d'être infectés de tuberculose dans les cas suivants :

a) Après constatation de lésions évocatrices de tuberculose à l'abattoir ou lors d'une autopsie ;

b) Après constatation de lésions histologiques évocatrices de tuberculose par un laboratoire agréé ;

c) Après constatation d'un résultat positif à une analyse par la méthode PCR réalisée par un laboratoire agréé sur un animal issu d'un troupeau officiellement indemne ;

d) Après constatation de réactions non négatives par intradermotuberculination ou au test de dosage de l'interféron gamma ou à la sérologie ou à tout autre méthode reconnue par le ministère en charge de l'agriculture conformément à l'article 8, réalisées par un laboratoire agréé ou par le laboratoire national de référence, lors d'une opération de prophylaxie ou lors d'un autre contrôle quelle que soit la circonstance qui l'ait motivé.

3° Infectés de tuberculose dans les cas suivants :

a) Après constatation de signes cliniques de tuberculose associés à une réaction positive par intradermotuberculination ;

b) Après isolement et identification de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* ou *Mycobacterium tuberculosis* ;

c) Après observation, sur le même animal, d'une réaction d'intradermotuberculination comparative positive associée à l'observation dans un laboratoire agréé de lésions histologiques évocatrices de tuberculose ;

d) Après observation, sur le même animal, d'une analyse PCR positive associée à l'observation de lésions histologiques évocatrices de tuberculose ;

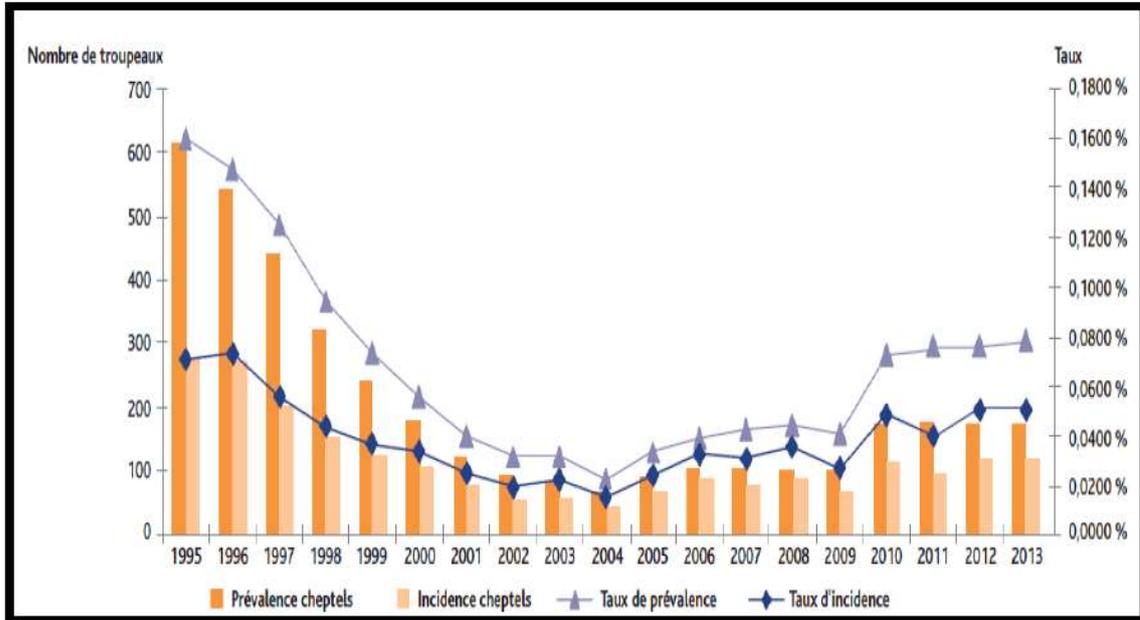
e) Après observation d'une analyse PCR positive confirmée par la mise en évidence spécifique de l'ADN bactérien de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* ou *Mycobacterium tuberculosis* ;

f) Après observation d'une analyse PCR positive sur un animal provenant d'un troupeau suspect ou susceptible d'être infecté.

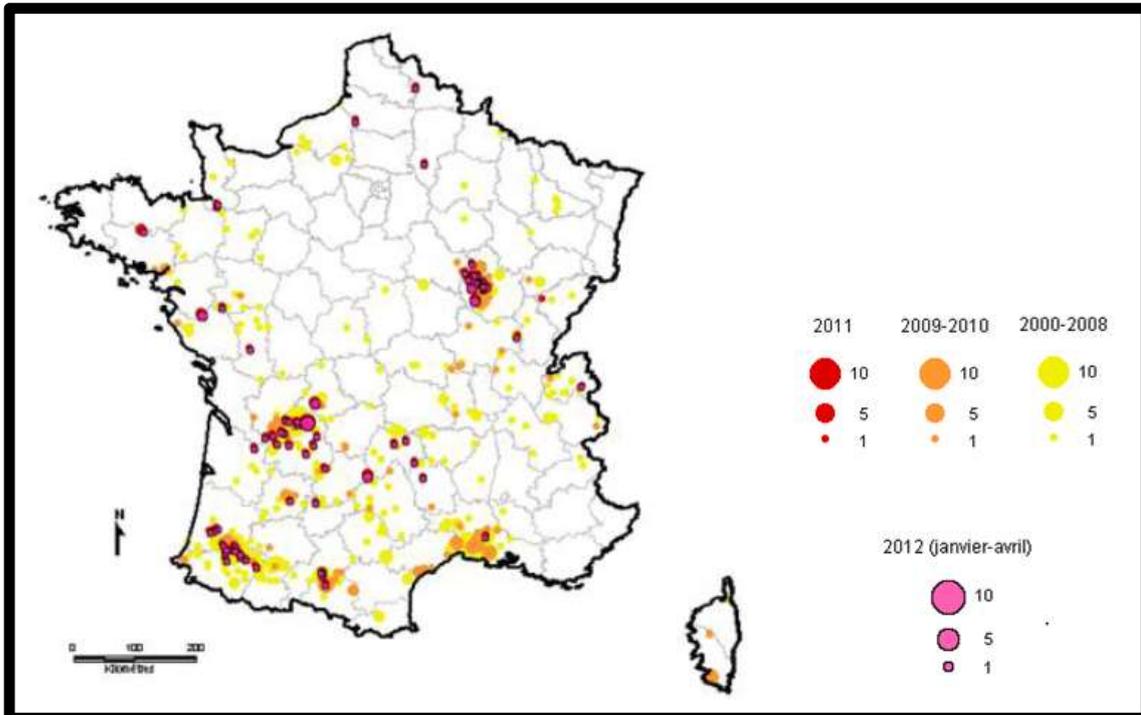
4° Contaminés de tuberculose lorsque, appartenant à un troupeau déclaré infecté de tuberculose, ils ne répondent pas aux critères définis au 3° ci-dessus.

**Annexe VI : Evolution spatio-temporelle de la tuberculose bovine en France**

**1. Évolution des taux de prévalence et d'incidence annuelles des élevages infectés de tuberculose bovine en France de 1995 à 2012 (Fediaevsky *et al.*, 2014)**



**2. Évolution du nombre de départements hébergeant des foyers de tuberculose bovine en France de 2001 à 2010 (Fediaevky *et al.*, 2011)**

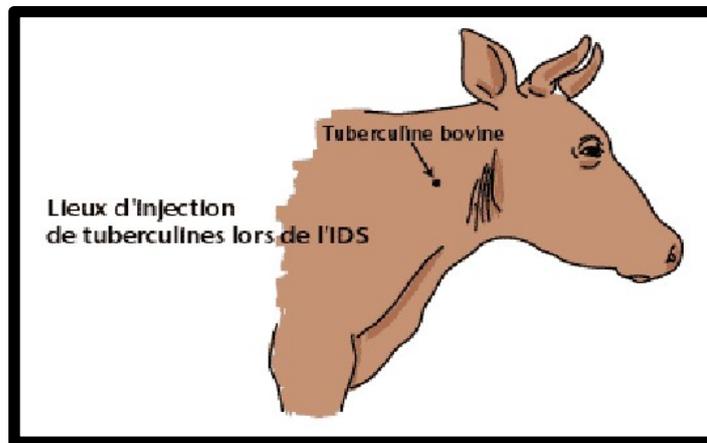


## Annexe VII : La réalisation d'une IDS

### 1. Etapes de la réalisation de l'IDS

- a) Vérification de l'absence de grosseur ou de lésion et la tonte du site d'injection (aux ciseaux de préférence).
- b) A J0 : Injection intradermique de 0,1 mL de tuberculine bovine PPD et vérification de la formation d'une petite vésicule au site d'injection.
- c) A J3 (72 heures) : Mesure du pli de peau au cutimètre a ressort, noter la mesure et calculer le différentiel avec la mesure à J0.

### 2. Lieu d'injection



### 3. Interprétation des résultats

$\Delta B = \text{mesure (J0+72h)} - \text{mesureJ0}$  :

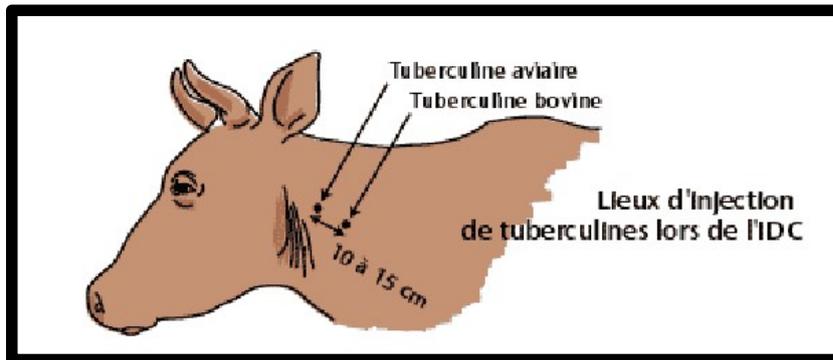
Résultat	Interprétation
$\Delta B \leq 2 \text{ mm}$	Négatif
$\Delta B \geq 4 \text{ mm}$	Positif
$2 \text{ mm} < \Delta B < 4 \text{ mm}$	Douteux

## Annexe VIII : La réalisation d'une IDC

### 1. Etapes de la réalisation de l'IDC

- a) Vérification de l'absence de grosseur ou de lésion et la tonte des deux lieux d'injection (aux ciseaux de préférence) puis mesure des deux plis de peau à J0 (A0 et B0).
- b) A J0 : Injection intradermique de 0,1 ml de tuberculine bovine et de 0,1 ml de tuberculine aviaire et vérification de la formation d'une petite vésicule au site d'injection.
- c) A J3 (72 heures) : Mensuration des plis de peau au cutimètre a ressort, noter les mesure A3, B3 et calcule des différentiels

### 2. Lieu d'injection



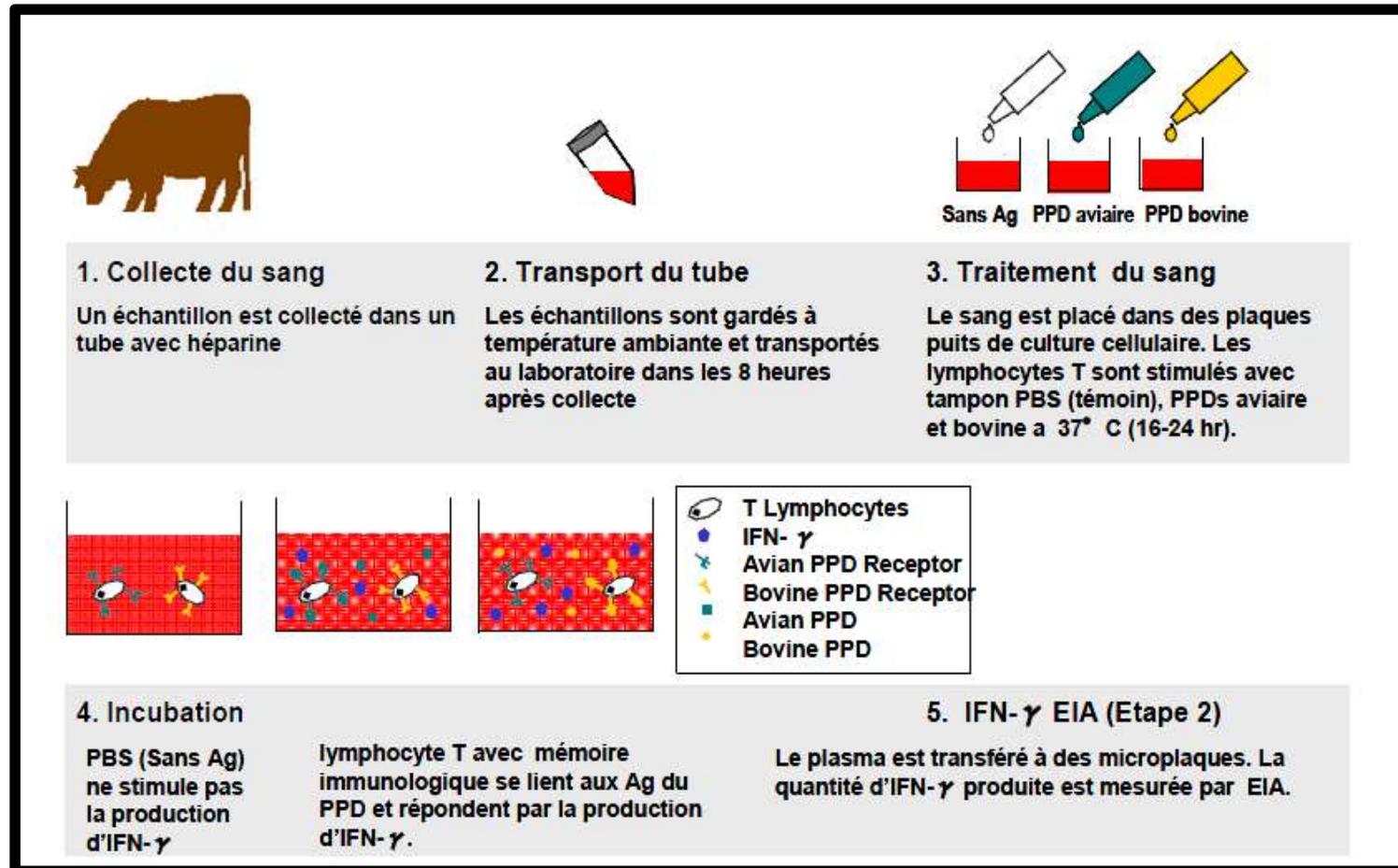
### 3. Interprétation des résultats

$\Delta B =$  mesure (J0+72h) – mesure J0    ET     $\Delta A =$  mesure (J0+72h) - mesure J0 :

Résultat	Interprétation
- $\Delta B \leq 2\text{ mm}$	Négatif (quelle que soit la valeur de $\Delta B - \Delta A$ )
- $\Delta B > 2\text{ mm ET}$ - $\Delta B - \Delta A < 1\text{ mm}$	Négatif
- $\Delta B > 2\text{ mm ET}$ - $1\text{ mm} \leq \Delta B - \Delta A \leq 4\text{ mm}$	Douteux (On parle de 'grand douteux' si $\Delta B > 4\text{ mm}$ ou de petit douteux sinon)
- $\Delta B > 2\text{ mm ET}$ - $\Delta B - \Delta A > 4\text{ mm}$	Positif

**Important :** L'interprétation des résultats de l'IDC n'est possible qu'à l'échelle du troupeau ; elle ne se fonde pas sur le résultat particulier d'un animal.

**Annexe VIII : Principe du test « Interféron gamma » (d'après ML. Boschioli, Anses, LERPAZ, Unité zoonoses bactériennes, LNR Mycobactéries, Maisons-Alfort)**



**Annexe X : Synthèse sur les facteurs influençant la réponse au test de dosage de l'IFN, présentés par ordre chronologique de publication pour chaque paramètre d'étude, inspiré de Anses, 2012**

(1/2)

Paramètre	Détailles de l'influence
<b>Intradermo-tuberculination</b>	Une intradermotuberculination préalable n'inhibe pas la réponse IFN $\gamma$ . L'IDT préalable semble augmenter la réponse au test IFN (Wood et Jones, 2001)
	DO plus élevées chez les bovins sensibilisés lorsqu'une IDS au pli sous caudal a été effectuée entre 3 et 28 jours avant le prélèvement sanguin par rapport aux DO des bovins n'ayant pas été soumis à l'IDS (Whipple <i>et al.</i> , 2001)
	Une IDC effectuée 3 à 65 jours avant le prélèvement n'influe pas sur la réponse IFN chez des animaux infectés (Gormley <i>et al.</i> , 2004)
	Après une IDS au pli sous-caudal, la réponse IFN est augmentée mais pas après une IDC à l'encolure. La Se du test IFN ne semble pas affectée par la réalisation préalable d'une IDC (Vordermeier <i>et al.</i> , 2004)
	L'IDS au pli sous-caudal peut augmenter significativement la réponse IFN chez les bovins infectés, ce qui n'est pas le cas avec l'IDS au niveau de l'encolure. Le prélèvement de sang pour test IFN peut être réalisé dès 3 jours après l'IDS sans impact sur les conclusions du test (de la Rua-Domenech <i>et al.</i> , 2006)
	Pas d'influence d'une IDS réalisée entre 3 et 10 jours avant le prélèvement sur la réponse IFN $\gamma$ (Coad <i>et al.</i> , 2007b)
	Une IDC préalable ne semble pas influencer sur le test de dosage IFN. L'IDS caudale stimule la réponse IFN pendant au moins 7 jours sans changement sur l'issue du test (Schiller <i>et al.</i> , 2010b)
<b>Stockage des</b>	La mise en culture du sang le lendemain par rapport au jour de prélèvement n'impacte pas les résultats de Se et Sp du test IFN (Ryan <i>et al.</i> , 2000)
<b>prélèvements</b>	Un stockage des prélèvements sanguins durant 24 h n'a aucune influence sur l'issue du test IFN (Wood et Jones, 2001)
	Les DO sont plus élevées si le test est effectué 2 heures après les prélèvements que s'il est effectué 24h après. Il n'y a toutefois pas de différence sur l'issue du test (positif/négatif) (Whipple <i>et al.</i> , 2001)
<b>sanguins</b>	Les DO sont plus faibles si le test est réalisé 24h après les prise de sang que 8h après. En outre, pour les bovins positifs en IDC, 75,9 %- 97,7 % des animaux IFG+1 à 8h sont toujours IFG+ à 24h. Parmi les bovins négatifs en IDC, 51,7 % des animaux IFG-2 à 8h sont IFG- à 24h (Gormley <i>et al.</i> , 2004)
	Un stockage de 24h des prélèvements après la réalisation des prises de sang n'influe pas la réponse au test IFN (Coad <i>et al.</i> , 2007b)
	Baisse des DO moyennes si on réalise une pré-incubation des échantillons à 37°C pendant 2h. Baisse des DO moyennes si les échantillons sont conservés 8 à 24 h avant analyse par rapport aux échantillons testés immédiatement après prélèvement. DO moyennes identiques quelle que soit la température de conservation des prélèvements (4° ou 22°C) (Waters <i>et al.</i> , 2007)

**Annexe X : Synthèse sur les facteurs influençant la réponse au test de dosage de l'IFN, présentés par ordre chronologique de publication pour chaque paramètre d'étude, inspiré de Anses, 2012**

(2/2)

<b>Paramètre</b>	<b>Détailles de l'influence</b>
<b>Atelier</b>	Apparemment moins de faux positifs dans les élevages d'engraissement (Cagiola <i>et al.</i> , 2004)
<b>Logement</b>	Apparemment moins de faux positifs si les bovins sont en logettes par rapport à la stabulation (Cagiola <i>et al.</i> , 2004 )
<b>Corticoïdes</b>	Baisse significative de la réponse IFN sous l'effet de la dexaméthasone (Goff, 1996)
<b>Physiologie</b>	La parturition comme d'autres états physiologiques immunosuppresseurs entraînent une baisse significative de la réponse IFN (Wood et Jones, 2001)
<b>Age</b>	Les bovins de moins de 6 mois peuvent produire de grande quantité d'IFN via les NK ; ils fournissent donc plus de réactions faussement positives que les bovins plus âgés (Gormley <i>et al.</i> , 2013)
<b>Stade d'infection</b>	Résultats variables suivant le stade d'infection et la mise en place de la RIMC (Gormley <i>et al.</i> , 2006)
<b>Tuberculine</b>	Pas de différence de DO entre PPD aviaires des États-Unis et australiennes. Les DO obtenues avec les PPD bovines des États-Unis sont supérieures à celles obtenues avec les PPD bovines australiennes mais il n'y pas différence sur l'issue du résultat (Whipple <i>et al.</i> , 2001)
<b>Paratuberculose</b>	Un troupeau infecté de paratuberculose présente des réponses au test IFN conventionnel significativement supérieures à celles d'un troupeau non-infecté de paratuberculose. Toutefois les réponses IFN avec des antigènes recombinants sont similaires (Aagaard <i>et al.</i> , 2010)

(1/2)



## Formulaire d'adhésion au protocole expérimental de diagnostic de la tuberculose bovine

**Présentation du protocole :** La tuberculose bovine est une maladie contagieuse d'évolution lente et difficile à diagnostiquer dont la France est officiellement indemne, ce qui signifie que la maladie est très rare et plus de 99,9% des troupeaux sont indemnes. La persistance de la maladie dans certaines zones d'élevage menace le maintien du statut et il est essentiel pour la filière bovine de poursuivre l'éradication.

Le système de contrôle de la tuberculose bovine est très contraignant mais ne peut évoluer sans base scientifique indiscutable.

Les tests cutanés de terrain, intradermotuberculation simple (IDS) ou comparative (IDC), sont difficiles à mettre en œuvre et doivent être espacés de 42 jours au moins si des recontrôles sont nécessaires.

Le test de dosage de l'interféron Gamma (IFG) est un test de laboratoire réalisé sur du sang, il est beaucoup plus cher mais il est moins contraignant en termes de manipulation des animaux. Des études suggèrent que ce test pourrait remplacer le recontrôle par IDC.

Le ministère en charge de l'agriculture a décidé de mettre en place, en relation avec la Commission européenne et la Plateforme nationale d'épidémiologie (www.plateforme-ESA.fr), un protocole expérimental à grande échelle pour valider cette hypothèse. Dans le cadre de ce protocole vous pourrez bénéficier de mesures d'allègements vis-à-vis de la suspension de qualification et de mesures plus ciblées d'abattages diagnostiques (voir détails page 2).

En cas d'inobservation ou de retrait du protocole, les résultats de dépistage nécessaires à la gestion de la suspicion n'ayant pas été obtenus, aucune dérogation d'abattage ou de recontrôle ne pourra être obtenue.

**Votre engagement dans ce protocole contribue à faire évoluer la réglementation.**

*Formulaire à retourner à la DDecPP, daté et signé en faisant précéder de la mention « Lu et approuvé »*

L'éleveur (Nom, EDE) :

Le vétérinaire sanitaire (Nom, n° d'ordre) :

(2/2)

**Description du protocole et actions attendues de la part de l'éleveur et du vétérinaire sanitaire vis-à-vis des conditions particulières exigées par le protocole expérimental**

1. Les bovins inclus dans le protocole sont tous les bovins ayant présenté une réaction non négative en IDS ou en IDC.
2. L'éleveur et le vétérinaire sanitaire s'engagent à effectuer les tuberculinations des bovins inclus par la méthode objective, avec mesures des plis de peau, effectués à l'aide d'un cutimètre à cadran, le jour de l'injection ( $J_0$ ) et le jour de la lecture ( $J_{0+2}$ ). Si le pli de peau n'a pas pu être mesuré à  $J_0$ , il doit être mesuré à  $J_{0+2}$  sur l'autre côté de l'encolure.
3. Le vétérinaire renseigne les valeurs des plis de peau mesurés sur tous les bovins inclus sur le compte rendu de résultats (voir modèle dans la note DGAI/SDSPA/N2012-8257), complète l'identification des bovins à l'aide des étiquettes à code barre (ou copie le numéro si l'étiquette n'est pas disponible) et adresse par voie postale l'original des comptes rendus à la direction départementale en charge de la protection des populations (DDecPP) et prévient sans délais la DDecPP afin d'organiser la suite des opérations.
4. L'éleveur et le vétérinaire sanitaire autorisent la transmission du compte rendu de résultats à un tiers pour en assurer la saisie informatique et pour l'exploitation des données sous forme anonyme.
5. Les bovins inclus dans le protocole, font l'objet d'une prise de sang pour le test IFG au plus tard 5 jours après la lecture (soit entre  $J_{0+2}$  et  $J_{0+3}$ ). Un volume de 10 ml de sang doit être recueilli dans un tube hépariné (bouchon vert) et transporté au moins de 8 heures au laboratoire d'analyse, à une température de 17 à 23 °C.
6. Conduite à tenir en fonction du résultat du test IFG à  $J_{0+2}$  :
  - a. Si le résultat initial est une IDC positive, la suspicion de tuberculose est forte, les bovins IDC positifs doivent être testés en IFG et, dans tous les cas, faire l'objet d'un abattage diagnostique. Les autres bovins du troupeau seront gérés comme dans le cas b.b.
  - b. Si le résultat du test IFG est positif, la suspicion de tuberculose est forte. La qualification officiellement indemne de tuberculose bovine du troupeau est suspendue. Les bovins réagissants sont maintenus 42 jours isolés du reste du troupeau. À l'issue des 42 jours une IDC et un prélèvement de sang pour test IFG sont réalisés sur les bovins réagissants à  $J_{0+2}$ . L'IDC est lue à  $J_{0+2}$ . Ces bovins font l'objet d'un abattage diagnostique systématique quelque soit le résultat des nouveaux tests l'IDC et IFG pratiqués à  $J_{0+2}$ . Les autres bovins du cheptel doivent faire l'objet d'un nouveau contrôle.
  - c. Si le résultat du test IFG est négatif ou non conclusif, la suspicion de tuberculose est faible, le troupeau fait l'objet d'une limitation partielle de mouvement : les bovins réagissants sont isolés et consignés dans l'exploitation, les autres bovins peuvent circuler. Après un délai de 42 jours une nouvelle IDC et un prélèvement de sang pour test IFG sont réalisés sur les bovins ayant réagi à  $J_0$  (à l'exclusion de bovins positifs à l'IDC qui ont déjà été abattus). L'IDC est lue à  $J_{0+2}$ .
    - Si les résultats des tests IFG et IDC à  $J_{0+2}$  sont négatifs sur tous les animaux testés la limitation partielle de mouvement est levée.
    - Si les résultats des tests IFG et IDC à  $J_{0+2}$  ne sont pas négatifs, la qualification officiellement indemne du troupeau est suspendue et ne pourra être restituée qu'à l'issue d'abattage(s) diagnostique(s) de bovins, dont le choix sera indiqué par la DDecPP.
    - Si les résultats d'abattage(s) diagnostique(s), sont favorables, la suspension de qualification du troupeau est levée
    - Si les résultats d'abattage(s) diagnostique(s) ne sont pas favorables le troupeau est déclaré infecté.

## Annexe XII : Grilles d'interprétation du test IFN

Les grilles utilisées pour procéder à l'interprétation du test Bovigam :

		PPD		
		<0,05	≥0,05	≥0,3
Mix	<0,03	NEGATIF	NON CONCLUSIF	POSITIF
	≥0,03	NON CONCLUSIF	POSITIF	POSITIF
		POSITIF SI PPD BOV >0,7		
≥0,1	POSITIF	POSITIF	POSITIF	

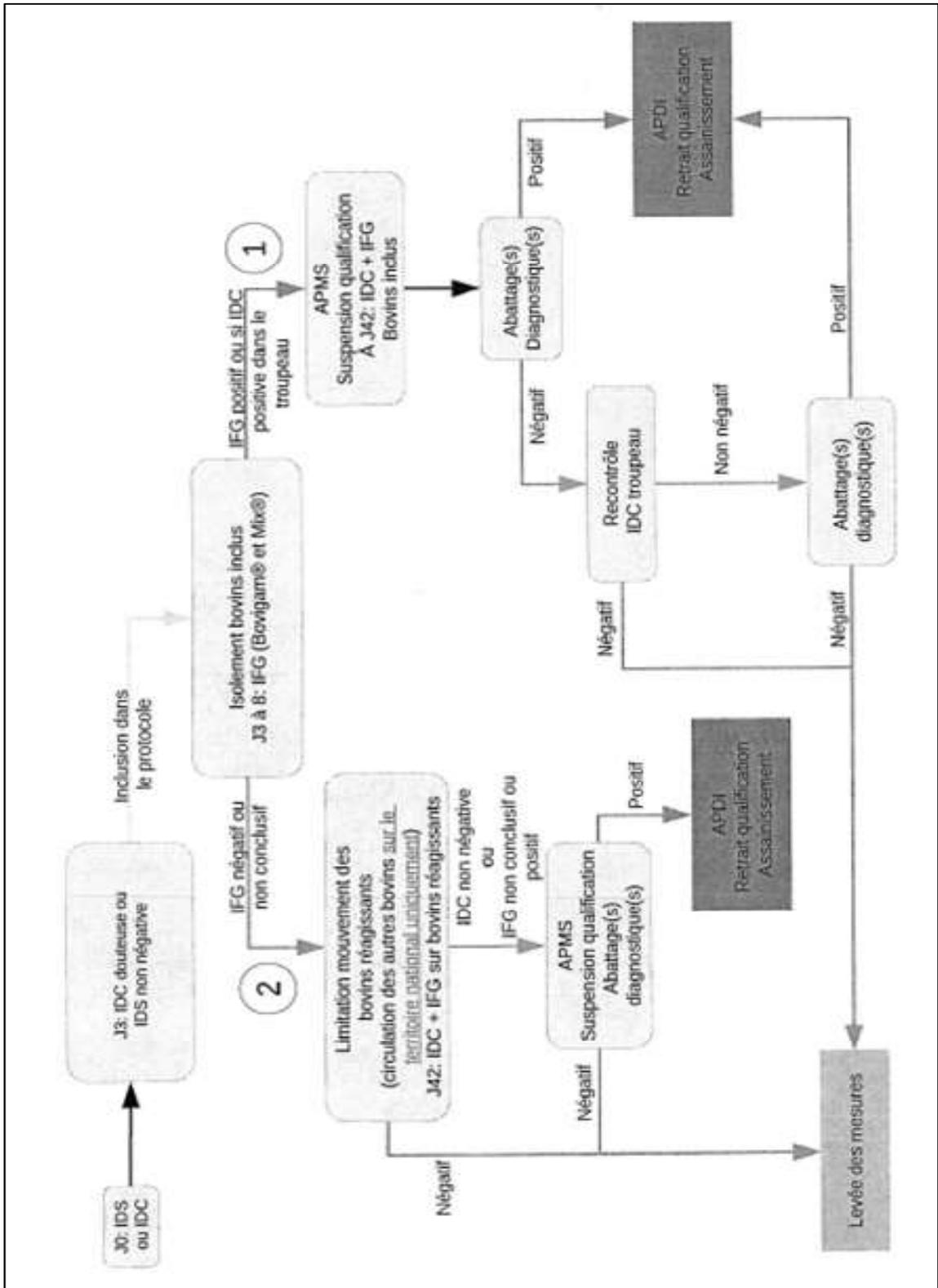
RATIO PPD	RATIO EC	RATIO PPD B	INTERPRETATION DU TEST
Négatif	Négatif	Sans objet	NEGATIF
POSITIF	POSITIF	Sans objet	POSITIF
POSITIF	POSITIF FORT	Sans objet	POSITIF
POSITIF FORT	POSITIF FORT	Sans objet	POSITIF
POSITIF FORT	POSITIF	Sans objet	POSITIF
Négatif	POSITIF	Négatif	NON CONCLUSIF
Négatif	POSITIF	POSITIF	POSITIF
POSITIF	Négatif	Sans objet	NON CONCLUSIF
POSITIF FORT	Négatif	Sans objet	POSITIF
Négatif	POSITIF FORT	Sans objet	POSITIF
ININTERPRETABLE*	ININTERPRETABLE*	Sans objet	ININTERPRETABLE

\*Si les critères de validation du PBS ne sont pas valides, les ratios PPD, EC et PPDB sont rendus « ININTERPRETABLE ». Si le PWM est en dessous du seuil sur un échantillon POSITIF sur la base des valeurs de PPD, EC et PPDB, l'échantillon doit être interprété comme « POSITIF ».

En revanche, les échantillons NEGATIFS ou NON CONCLUSIFS sur la base des valeurs de PPD, EC et PPDB avec un PWM négatif seront rendus « ININTERPRETABLE ».

Dans le cas de résultats ininterprétables, Il est impératif de répéter des prises de sang pour une nouvelle analyse IFN

**Annexe XIII : Arbre décisionnel présentant le schéma décisionnel du protocole expérimental d'évaluation de l'IFN**



**Annexe XIII : Données rapportées dans la base de données pour chaque animal**

<b>Paramètres</b>	<b>Signification</b>	
<b>Dpt</b>	Département d'où provient l'animal	
<b>EDE</b>	Numéro EDE de l'élevage	
<b>Année</b>	Année d'inclusion dans le protocole expérimental	
<b>IPG</b>	Numéro d'identification du bovin	
<b>Contrôle</b>	Indique s'il s'agit du 1er contrôle ou du second (à 42 jours) pour les animaux retestés.	
<b>Type inclusion</b>	Indique si l'animal a été inclus dans le protocole ou bien s'il s'agit d'un contrôle dans les départements à risque	
<b>Foyer</b>	0 si l'élevage est indemne et 1 s'il est infecté.	
<b>DATE-IDT1</b>	Présente la date de réalisation du premier test cutané	
<b>DATE-IDT2</b>	Présente la date de réalisation du second test cutané	
<b>TECH-IDT1</b>	Présente la technique utilisée (IDS ou IDC) lors de la réalisation du premier test cutané	
<b>TECH-IDT2</b>	Présente la technique utilisée (IDS ou IDC) lors de la réalisation du second test cutané	
<b>Res-l'IDT1</b>	Le résultat de l'IDT1, simple ou comparative. Pos pour positif, neg pour négatif, NA lorsque les données ne sont pas disponibles, dtx lorsque le résultat est douteux.	
<b>Res-l'IDT2</b>	Le résultat de l'IDT2, simple ou comparative. Pos pour positif, neg pour négatif, NA lorsque les données ne sont pas disponibles, dtx lorsque le résultat est douteux.	
<b>DATE-IFG1</b>	Présente la date de réalisation du premier test d'interféron.	
<b>DATE-IFG2</b>	Présente la date de réalisation du second test d'interféron.	
<b>Abdc</b>	Indique s'il y a eu (ou non) un diagnostic de confirmation à l'abattoir	
<b>Résultat PCR</b>	Transmet les résultats des PCR sur les lésions. 1 lorsqu'il est positif et 0 lorsqu'il est négatif.	
<b>Résultat Culture</b>	Le résultat de la culture lorsqu'il y a eu une culture. 1 pour résultat positif et 0 pour résultat négatif.	
<b>Résultat PCR à partir de la culture</b>	Idem mais pour le résultat d'une PCR à partir de la culture.	
<b>TN</b>	Ensemble des paramètres permettant l'interprétation des résultats du test de dosage de l'interféron gamma (cf. première partie).	
<b>TP</b>		
<b>DO PPD Bov (B)</b>		
<b>DO PPD Av (A)</b>		
<b>DO MIX (EC-PC)</b>		
<b>DO PBS (RPMI)</b>		
<b>DO PWM</b>		
<b>RATIO PPD BOV</b>		
<b>RATIO PPD=BOVIGAM</b>		
<b>RATIO MIX</b>		
<b>Bilan global</b>		Le résultat de l'interféron : Pos pour positif, neg pour négatif, NC pour non concluant (l'équivalent de douteux pour l'intradermotuberculination) et inint lorsque le résultat est ininterprétable.

**Annexe XV : Analyses effectuées séparément chez les animaux ayant été testés par une IDS lors de l'IDT1 et chez les animaux ayant été testés par une IDC**

(1/3)

**1. Etude de la validité des tests employés :**

Afin de déterminer et de mieux comprendre l'impact de l'IDS et de l'IDC sur l'IFN, nous avons décidé de faire les calculs séparément chez les animaux ayant été testé par une IDS lors du premier IDT et chez les animaux ayant été testé par une IDC.

**Animaux ayant subi une IDS :**

Parmi les 811 animaux indemnes retenus pour le calcul des spécificités des tests, 467 animaux avaient reçu une IDS à l' occasion du premier test cutané.

Les spécificités « Sp » des tests effectués sur les animaux indemnes ayant reçus une IDS étaient de :

- Sp IDT2 = 86,1 % [82,6 ; 88,9] IC 95 %
- Sp IFN1 = 62,6 % [58,1 ; 66,9] IC 95 %
- Sp IFN2 = 67,2 % [62,8 ; 71,3] IC 95 %

Nous constatons que le test IDT2 était significativement plus spécifique que l'IFN1 (Test de Mc Nemar,  $p = 7,29 \times 10^{-16}$ ) et que la spécificité de ce dernier était similaire à celle de l'IFN2 (test de Mc Nemar,  $p = 0,10$ ).

**Animaux ayant subi une IDC :**

Parmi les 811 animaux indemnes retenus pour le calcul des spécificités des tests, 484 animaux avaient reçu une IDC lors du premier test cutané.

Les spécificités « Sp » des tests effectués sur les animaux indemnes ayant reçus une IDS étaient de :

- Sp IDT2 = 90,2 % [87,3 ; 92,6] IC 95 %
- Sp IFN1 = 37,1 % [32,9 ; 41,5] IC 95 %
- Sp IFN2 = 56,1 % [51,6 ; 60,4] IC 95 %

Nous constatons que le test IDT2 était significativement plus spécifique que l'IFN1 ( $p = 1,004 \times 10^{-51}$ ) et que ce dernier était moins spécifique que l'IFN2 ( $p = 6,83 \times 10^{-13}$ ).

**Ainsi, les valeurs de la spécificité individuelle calculées séparément chez les animaux indemnes ayant reçu une IDS a l'IDT1 et ceux ayant reçu une IDC a l'IDT1, étaient similaires à celles calculées précédemment tous types de tests IDT confondus, et le test intradermique était toujours plus spécifique que les tests IFN quelle que soit la technique utilisée à l'occasion de l'IDT.**

**Annexe XV : Analyses effectuées séparément chez les animaux ayant été testés par une IDS lors de l'IDT1 et chez les animaux ayant été testé par une IDC**

(2/3)

**2. Approche de l'influence de l'injection de tuberculine sur les résultats qualitatifs du test de dosage de l'interféron gamma :**

**Animaux ayant subi une IDS**

Un total de 54 animaux indemnes étaient inclus dans le cadre du protocole avec des résultats aux tests cutanés identiques et avaient subi une IDS lors du premier test d'IDT.

Nous avons observé que le pourcentage des animaux positifs à l'IFN1, n'était pas significativement différent (test de Mc Nemar,  $p = 0,26$ ) du pourcentage des animaux positifs à l'IFN2. Ce résultat était en contradiction des résultats précédents et peut s'expliquer par un manque de puissance statistique.

Nous avons également observé que le nombre d'animaux de la première catégorie pour lesquels les résultats aux deux IFN étaient identiques était plus important que le nombre d'animaux des deux autres catégories regroupées (pour lesquels la réponse IFN avait varié). D'autre part, parmi les animaux dont le résultat IFN a varié, le nombre d'animaux pour lesquels le résultat d'IFN s'était « négativé » était légèrement supérieur au nombre d'animaux pour lesquels la réponse s'était « positivée ».

**Les animaux ayant subi une IDC**

Un total de 40 animaux indemnes étaient inclus dans le cadre du protocole avec des résultats aux tests cutanés étaient identiques et avaient subi une IDC lors du premier test d'IDT.

Nous avons observé que le pourcentage des animaux positifs à l'IFN1, n'était pas significativement différent (test de Mc Nemar,  $p = 0,11$ ) du pourcentage des animaux positifs à l'IFN2. Ce résultat était en contradiction des résultats précédents et pourrait s'expliquer par un manque de puissance statistique.

Nous avons également pu constater que le nombre d'animaux de la première catégorie pour lesquels les résultats aux deux IFN étaient identiques était plus important que le nombre d'animaux des deux autres catégories regroupées (pour lesquels la réponse IFN avait varié). D'autre part, parmi les animaux dont le résultat IFN a varié, le nombre d'animaux pour lesquels le résultat d'IFN s'était « négativé » était légèrement supérieur au nombre d'animaux pour lesquels la réponse s'était « positivée ».

**Les analyses faites sur les animaux indemnes ayant reçu une IDS lors du premier test d'IDT n'ont montré aucun effet sur les résultats des tests IFN. Ces résultats n'étaient pas cohérents avec les autres résultats de notre étude (l'étude de la validité des tests et l'approche quantitative) ce qui pourrait être expliqué par un manque de puissance statistique.**

## **Annexes XV : Analyses effectuées séparément chez les animaux ayant été testé par une IDS lors de l'IDT1 et chez les animaux ayant été testé par une IDC**

(3/3)

### **3. Approche de l'influence de l'injection de tuberculine sur les résultats quantitatifs du test de dosage de l'interféron gamma :**

#### **Animaux ayant subi une IDS :**

Un total de 54 animaux indemnes étaient inclus dans le cadre du protocole avec des résultats aux tests cutanés identiques et avaient subi une IDS lors du premier test d'IDT.

On a observé chez ces animaux une diminution globale des ratios de densité optique entre le premier et le second test. La production moyenne d'IFN suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente, selon l'existence d'une injection préalable (J3) ou non (J42) (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,009$ ) et la réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42. Il en était de même concernant la PPD aviaire (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,007$ ). Avec le MIX en revanche, la différence n'était pas significative (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,43$ ).

#### **a) Animaux ayant subi une IDC**

Un total de 40 animaux indemnes étaient inclus dans le cadre du protocole avec des résultats aux tests cutanés identiques et avaient subi une IDC lors du premier test d'IDT.

Les mêmes résultats ont été enregistrés, On a observé chez ces animaux une diminution globale des ratios de densités optiques entre le premier et le second test. La production moyenne d'IFN suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente, selon l'existence d'une injection préalable (J3) ou non (J42) (test de Student pour séries appariées,  $p = 3,493 \times 10^{-07}$ ) et la réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42. Il en était de même concernant la PPD aviaire (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,003$ ). Avec le MIX en revanche, la différence n'était pas significative (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,12$ ).

**Les résultats obtenus en séparant les animaux selon la nature de l'IDT1 étaient très similaires à ceux obtenus en les regroupant. La réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42, et ce, dans tous les cas.**

## **Annexe XVI : Résultats du test Bovigam seul :**

(1/2)

### **1. Approche qualitative :**

#### **1.1. Les animaux indemnes**

##### Animaux inclus dans le protocole :

Un total de 94 animaux indemnes entrés dans le protocole pour lesquels les résultats des tests cutanés étaient identiques, ont été inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul : Nous avons pu mettre en évidence que le pourcentage des animaux ayant obtenu des résultats non-négatifs à l'IFN1 (62,8 % = 59/94) était significativement différent (Test de Mc Nemar,  $p = 0,04$ ) du pourcentage des animaux non-négatifs à l'IFN2 (50 % = 47/94),

##### Animaux inclus dans en SR

Au total 267 animaux indemnes provenant d'élevages en suivi renforcé et qui avaient des résultats identiques aux tests cutanés, ont été inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul :

Nous avons pu mettre en évidence que le pourcentage des animaux à résultat non-négatif à l'IFN1 (45,3 % = 121/267) était significativement différent (test de Mc Nemar,  $p = 1,75 \cdot 10^{-11}$ ) du pourcentage des animaux non-négatifs à l'IFN2 (21,7 % = 58/267).

#### **1.2. Les animaux infectés**

##### Animaux inclus dans le protocole

Sur les 17 bovins infectés entrés dans le protocole et qui ont été inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul :

Nous avons observé que les nombres des animaux non-négatifs aux tests IFN1 (15/17) et IFN2 (16/17) sont quasiment identiques (test de Mc Nemar,  $p = 1$ ).

##### Animaux inclus dans en SR

Sur les 16 bovins infectés provenant d'élevages en suivi renforcé et qui ont été inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul : Nous avons observé que tous les animaux (16/16) ont fourni un résultat identique (négatif ou non-négatif) aux deux IFN.

## **Annexe XVI : Résultats du test Bovigam seul :**

(2/2)

### **2. Approche quantitative**

#### **2.1. Chez les animaux indemnes**

##### Animaux inclus dans le protocole

Pour les 94 bovins indemnes entrés dans le protocole inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul, on a observé une diminution globale des densités optiques entre le premier et le second test. La production médiane d'IFN suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente, selon l'existence d'une injection préalable (J3) ou non (J42) (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,99 \times 10^{-07}$ ). Il en était de même concernant la PPD aviaire (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 7,37 \times 10^{-05}$ ). Avec le MIX en revanche, la différence n'était pas significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,18$ ). La réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42, et ce, dans tous les cas.

##### Animaux en SR

Pour les 267 animaux indemnes en SR ayant des résultats identiques aux tests cutanés inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul, on a pu noter une diminution globale des densités optiques entre le premier et le second test. La différence était non significative pour la PPD aviaire (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,35$ ). En revanche, la production médiane d'interféron suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente entre J3 et J42 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 3,1 \times 10^{-14}$ ). Il en était de même pour les moyennes obtenues avec le MIX (test de Student pour séries appariées,  $p = 1.13 \times 10^{-06}$ ).

#### **2.2. Chez les animaux infectés**

##### Animaux inclus dans le protocole

Au total, 17 bovins infectés entrés dans le protocole, ont été inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul :

On a pu noter une diminution globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test. Le test de Wilcoxon pour échantillons appariés (taille de notre effectif  $< 30$ ) nous permet de conclure que les médianes de la production d'interféron suite à la stimulation par la PPD aviaire et par la PPD bovine n'étaient pas significativement différentes (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,74$  et  $p = 0,14$ ). Pour le MIX, cette différence était significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,046$ ).

##### Animaux inclus dans en SR

16 bovins infectés en SR ont été inclus dans le cadre des analyses des résultats du Bovigam seul :

On a pu noter une augmentation globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test. Cependant, la médiane de la production d'IFN suite à la stimulation par la PPD aviaire n'était pas significativement différente, entre l'IFN1 et l'IFN2 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,38$ ). Il en était de même pour le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,72$ ) et la PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,10$ ).

# BIBLIOGRAPHIE

ARAÚJO CP de., LEITE CQF., PRINCE KA de., JORGE K dos SG., OSÓRIO ALAR. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005, 100, 749-752.

ACHA PN., SZYFRES B. Tuberculose zoonotique *In* : Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, Editions OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale), Paris. 2005, 261-278.

AAGAARD C., GOVAERTS M., MEIKLE V., GUTIÉRREZ-PABELLO JA., MCNAIR J., ANDERSEN P., et al. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev. Vet. Med.* 2010, 96, 161-169.

ALLIX C., WALRAVENS K., SAEGERMAN C., GODFROID J., SUPPLY P., FAUVILLE-DUFAUX M. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44, 1951-1962.

Arrêté du 14 août 1963 fixant les mesures techniques et administratives prises pour l'application du décret n°63-301 du 19 mars 1963 relatif à la prophylaxie de la tuberculose bovine. *JORF*, 22 août 1963.

BIET F., BOSCHIROLI ML., THOREL MF., GUILLOTEAU L. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC), *Vet. Res.* 2005, 36, 13-25.

Bovine tuberculosis (Chapter 2.4.7) *In* : *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE terrestrial manual 6th ed* (2008).

BENET J.J. La tuberculose animale. Polycopié. Écoles Nationales Vétérinaires Françaises, Unité Pédagogique des Maladies Contagieuses. 2008, 74p.

BENET JJ., Praud A. *et al* 2015. La tuberculose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Merial (Lyon), 100 p.

BÉNÉNET J. J. *La tuberculose animale*. Polycopié, Écoles Nationales Vétérinaires Françaises, Unité Pédagogique des Maladies Contagieuses. 2010, 74p.

BACH J. F. *Traité d'immunologie*. Édition Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 1993, 1205p.

BIET F., BOSCHIROLI ML., THOREL MF., GUILLOTEAU LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* 2005, 36, 411-436.

BENET J.J. et DUFOUR B. Analyses de données épidémiologiques produites par la lutte Contre la tuberculose bovine sur le terrain en France. Journée AEEMA-RFSA, mars 2014.

BÉNÉNET J. J., DUFOUR B., BOSCHIROLI M. L., GARIN-BASTUJI B., HARS J. *Réémergence de la tuberculose bovine en France : une maladie du passé, promise à un grand avenir ?* Journées nationales GTV – Nantes. 2011, 739 – 745.

BENET JJ., BOSCHIROLI ML., DUFOUR B., GARIN-BASTUJI B. Lutte contre la tuberculose bovine en France de 1954 à 2004 : analyse de la pertinence épidémiologique de l'évolution de la réglementation. *Epidémiol. et santé anim.* 2006, 50, 127-143.

BENET J.J. Pour en finir avec la tuberculose. *In* : *Vaccins et immunité, journées nationales des G.T.V.* Clermont Ferrand : 30-31 mai 2001, Paris : S.N.G.T.V., 417-424.

BUDDLE BM., DE LISLE GW., PFEFFER A., ALDWELL FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*. 1995, 13, 1123-1130.

BUDDLE BM., LIVINGSTONE PG., DE LISLE GW. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N. Z. Vet. J.* 2009, 57, 173-180.

BEZOS J., CASAL C., ROMERO B., SCHROEDER B., HARDEGGER R., RAEBER AJ., et al. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 2014.

Confédération suisse, OVF, Confédération Suisse, Office Vétérinaire Fédéral. Tuberculose, 2011, 5.  
CHATENOUD L., BACH J-F. *Immunologie*, 6e édition. ed. Médecine Sciences Publications, Paris. 2012, 469 p.

COURCOUL A. et al., Evaluation des caractéristiques des tests : comparaison de la culture bactérienne, de l'histopathologie et de la PCR. Numéro 65 de la revue de l'AEEMA, 2014.

CARDOSO M.A., CARDOSO R.F., HIRATA R.D.C., HIRATA M.H., LEITE C.Q.F., SANTOS A.C.B. et al. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. *Zoon. Publ. Health*, 2007, 56, 465-470.

CLIFTON-HADLEY R., SAUTER-LOUIS CM., LUGTON IW., JACKSON R., DURR PA., WILESMITH JW. *Mycobacterium bovis* infections, in: *Infectious Diseases of Wild Mammals*. 2000., Willians and Barker, p. 340-361.

CASSIDY JP., BRYSON DG., POLLOCK JM., EVANS RT., FORSTER F., NEILL SD. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *J. Comp. Pathol.* 1999, 121, 321-337.

COLLINS D.M., BUDDLE B.M., KAWAKAMI R.P., HOTTER G., MILDENHALL N., MOUAT P., et al. Newly attenuated *Mycobacterium bovis* mutants as vaccines against bovine tuberculosis, particularly for possums. *Vet. Microbiol.* 2011, 151, 99-103.

CAGIOLA M., FELIZIANI F., SEVERI G., PASQUALI P., RUTILI D. Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004, 11, 952-956.

CAGIOLA M., FELIZIANI F., SEVERI G., PASQUALI P., RUTILI D. Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004a, 11, 952-956.

CAGIOLA M., FELIZIANI F., SEVERI G., PASQUALI P., RUTILI D. Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004b, 11, 952-956.

COAD M., HEWINSON RG., CLIFFORD D., VORDERMEIER HM., WHELAN AO. Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec.* 2007, 160, 660-662.

DE LA RUA-DOMENECH R., GOODCHILD AT., VORDERMEIER HM., HEWINSON RG., CHRISTIANSEN KH. et al. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle : a review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 2006, 81, 190-210.

DEAN GS., RHODES SG., COAD M., WHELAN AO., COCKLE PJ., CLIFFORD DJ., et al. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 2005, 73, 6467-6471.

DUFOUR B., BENET J.J., BOSCHIROLI M.L., GANIERE J.P., GARIN-BASTUJI B., HARS J. et al. (2011). Tuberculose bovine et faune sauvage. Rapport ANSES [<http://www.anses.fr/Documents/SANT2010sa0154Ra.pdf>]

DURR PA., CLIFTON-HADLEY RS., HEWINSON RG. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 2000a, 19, 689-701.

- DURR PA., HEWINSON RG., CLIFTON-HADLEY RS. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 2000b, 19, 675-688.
- DELAFOSSÉ A., GOUTARD F., THEBAUD E. Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abeche, Tchad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 2002, 55, 5-13.
- DELAHAY RJ., SMITH GC., BARLOW AM., WALKER N., HARRIS A., CLIFTON-HADLEY RS., et al. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997. 2007, 173, 287-301.
- DEAN GS., RHODES SG., COAD M., WHELAN AO., COCKLE PJ., CLIFFORD DJ., et al. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 2005, 73, 6467-6471.
- FEDIAEVSKY A., BENET JJ., BOSCHIROLI ML., RIVIERE J., HARS J. (2012) La tuberculose bovine en France en 2011, poursuite de la réduction du nombre de foyers. *Bull. Épidémiol. Santé Anim. Alim.*, 54 (spécial MRE), 4-12.
- FEDIAEVSKY A., COURCOUL A., BOSCHIROLI ML., REVEILLAUD E. Tuberculose bovine en France en 2012 : des signaux favorables mais une situation toujours complexe dans certaines zones. *Bull. Épidémiol. Santé Anim. Alim.* 2013, 59 (spécial MRE), 4-10.
- FEDIAEVSKY A., DUFOUR B., BOSCHIROLI M.L., MOUTOU F. *Bilan de la surveillance de la tuberculose bovine en 2009 : une prévalence globalement faible mais un renforcement de la lutte dans certaines zones.* Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, 40 (Spécial MRC-Bilan 2009). 2010, 3 – 8.
- FEDIAEVSKY A., COURCOUL A., BOSCHIROLI ML., REVEILLAUD E. Tuberculose bovine en France en 2013 : résultats d'une stratégie plus offensive. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment.* 2014, 4-11.
- Gourreau J.M., Chastant S. *Guide pratique des maladies des bovins*, Editions France Agricole, Paris. 2012, 699 pages
- GORMLEY E., DOYLE MB., MCGILL K., COSTELLO E., GOOD M., COLLINS JD. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 102, 413-420.
- GANIERE J-P. *Cours de réglementation sanitaire vétérinaire générale. Polycopié. Écoles Nationales Vétérinaires Françaises, Unité Pédagogique des Maladies Contagieuses.* 2014,.
- GUTIÉRREZ M., TELLECHEA J., GARCÍA MARIN JF. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet. Microbiol.* 1998, 62, 281-290.
- GORMLEY E., DOYLE MB., FITZSIMONS T., MCGILL K., COLLINS JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet. Microbiol., 4th International Conference on Mycobacterium bovis 4th International Conference on Mycobacterium bovis.* 2006, 112, 171-179.
- GORMLEY E., DOYLE M., DUIGNAN A., GOOD M., MORE SJ., CLEGG TA. Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN $\gamma$ ) assay. *Vet. Res.* 2013, 44, 117.
- GOFF BS. Effect of dexamethasone treatment of tuberculous cattle on results of the gamma-interferon test for *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 53, 39-47.
- GORMLEY E., DOYLE M., DUIGNAN A., GOOD M., MORE SJ., CLEGG TA. Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN $\gamma$ ) assay. *Vet. Res.* 2013, 44, 117.

GORMLEY E., DOYLE MB., FITZSIMONS T., MCGILL K., COLLINS JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet. Microbiol., 4th International Conference on Mycobacterium bovis 4th International Conference on Mycobacterium bovis*. 2006, 112, 171-179.

HARBOE M., WIKER HG., DUNCAN JR., GARCIA MM., DUKES TW., BROOKS BW., et al. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 913-921.

HAUER A., COCHARD T., DE CRUZ K., KAROUÏ C., HENAULT S., BIET F., et al. Comparison by molecular methods of *M. bovis* strains isolated from bovine herds and wild animals. *Epidémiologie Santé Anim.* 2014, 77-86.

HADDAD N., OSTYN O., KAROUÏ C., MASSELOT M., THOREL M.F., HUGUES S.L., et al. Spoligotype Diversity of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3623–3632.

HUMBLET MF., BOSCHIROLI ML., SAEGERMAN C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle : a stratified approach. *Vet. Res.* 2009, 40 (5) : 50.

HANNA J., NEILL SD., O'BRIEN JJ. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 1992, 31, 243-249.

HARBOE M., OETTINGER T., WIKER HG., ROSENKRANDS I., ANDERSEN P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1996, 64, 16-22.

HOPE JC., THOM ML., VILLARREAL-RAMOS B., VORDERMEIER HM., HEWINSON RG., HOWARD CJ. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 2005, 141, 432-439.

LOBUE PA., ENARSON DA., THOEN CO. Tuberculosis in humans and animals: an overview. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 2010, 14, 1075-1078.

LIGHTBODY KA., SKUCE RA., NEILL SD., POLLOCK JM. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet. Rec.* 1998, 142, 295-300.

LILENBAUM W., RIBEIRO ER., SOUZA GN., MOREIRA EC., FONSECA LS., FERREIRA MA., et al. Evaluation of an ELISA-PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Res. Vet. Sci.* 1999, 66, 191-195.

MCGILL JL., SACCO RE., BALDWIN CL., TELFER JC., PALMER MV., WATERS WR. Specific recognition of mycobacterial protein and peptide antigens by  $\gamma\delta$  T cell subsets following infection with virulent *Mycobacterium bovis*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2014, 192, 2756-2769.

MOYEN JL., BRUGERE L., FAYE S., BOSCHIROLI ML. (2011) Utilisation de la PCR pour le diagnostic de la tuberculose bovine. *Point vét. Expert rural*, 42, (312), 68-72.

MCLERNON J., COSTELLO E., FLYNN O., MADIGAN G., RYAN F. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48, 4541-4545.

MARASSI CD., MEDEIROS L., LILENBAUM W. The use of a Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. *Acta Trop.* 2010, 113, 199-201.

Manuel Terrestre de l'OIE, Tuberculose bovine. Chapitre 2.3.3. 502-514.

O'REILLY LM., DABORN CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 1995, 76 Suppl 1, 1-46.

OIE Tuberculose bovine (Chapitre 2.4.7) In : Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, Editions OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale), Paris. 2008, 6e édition, 745-760.

OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale). Classification des maladies notifiables de l'OIE [en ligne]. Adresse URL : <http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2011/>.

OLSEN I., BOYSEN P., KULBERG S., HOPE JC., JUNGENSEN G., STORSET AK. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect. Immun.* 2005, 73, 5628-5635.

PAYNE A., BOSCHIROLI ML., GUENEAU E., MOYEN JL., RAMBAUD T. et al. La tuberculose bovine chez le blaireau (*Meles meles*) en France. *Épidémiol. et santé anim.* 2012, 62, 43-53.

PALMER MV., WATERS WR., THACKER TC., GREENWALD R., ESFANDIARI J., LYASHCHENKO KP. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 2006, 13, 387-394.

POLLOCK JM., GIRVIN RM., LIGHTBODY KA., CLEMENTS RA., NEILL SD. et al. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Vet. Rec.* 2000, 146, 659-665.

ROJAS-ESPINOSA O., LØVIK M. *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* infections in domestic and wild animals. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 2001, 20, (1), 219-251.

Rodriguez-Campos S. S., Smith N.H., Boniotti M.B., Aranaz. A. "Overview and Phylogeny of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Organisms: Implications for Diagnostics and Legislation of Bovine Tuberculosis." *Research in Veterinary Science* 97. 2014, 5-19.

ROBINSON P.A., CORNER L.A., COURCIER E.A., McNAIR J., ARTOIS M., MENZIES F.D., et al. BCG vaccination against tuberculosis in European badgers (*Meles meles*) : a review. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* 2012, 35, 277-287.

RADOSTITS O.M., HINCHCLIFF K.W, GAY C.C., CONSTABLE P.D. Veterinary Medicine : a text book of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th Ed. 2007, 1007-1016.

ROTHEL JS., JONES SL., CORNER LA., COX JC., WOOD PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 1990, 67, 134-137.

ROTHEL JS., JONES SL., CORNER LA., COX JC., WOOD PR. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J.* 1992, 69, 1-4.

RITACCO V., LOPEZ B., BARRERA L., TORREA G., NADER A., DE KANTOR IN., et al. Evaluation of four antigens for the detection of anti-*Mycobacterium bovis* antibodies by enzyme immunoassay. *Rev. Argent. Microbiol.* 1988, 20, 97-101.

RITACCO V., LÓPEZ B., DE KANTOR IN., BARRERA L., ERRICO F., NADER A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 1991, 50, 365-367.

RYAN TJ., BUDDLE BM., DE LISLE GW. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.* 2000, 69, 57-61.

SCHILLER I., VORDERMEIER M., WATERS R., WHELAN A., COAD M. et al. Bovine tuberculosis : effect of the tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, 136, (1-2), 1-11.

SCHILLER I., VORDERMEIER HM., WATERS WR., KYBURZ A., CAGIOLA M., WHELAN A., et al. Comparison of tuberculin activity using the interferon-gamma assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.*. 2010b, 167, 322-326.

THOREL M.F. (2003) *Tuberculose*. In : LEFEVRE P. C., BLANCOU J., CHERMETTE R., Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et région chaudes. Tome 2. Maladies bactériennes. Mycoses. Maladies parasitaires. Éditions Tec & Doc, Paris, 927 – 949.

TOMA B., DUFOUR., BÉNET., SANAA., SHAW., MOUTOU. *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. (3ème éd.). 2010,.

TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., et al. (2001) *Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeure*. 2ème édition Paris. 2001, AEEMA, 696p.

THOM M., MORGAN JH., HOPE JC., VILLARREAL-RAMOS B., MARTIN M., HOWARD CJ. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*. 2004, 102, 399-412.

VORDERMEIER M., GOODCHILD A., CLIFTON-HADLEY R., DE LA RUA R. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Vet. Rec.*. 2004, 155, 37-38.

[www.oie.int/en/internationalstandard-setting/terrestrial-manual/acces-online/](http://www.oie.int/en/internationalstandard-setting/terrestrial-manual/acces-online/)

WHIPPLE DL., BOLIN CA., MILLER JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.* 1996, 8, 351-354.

WHIPPLE DL., PALMER MV., SLAUGHTER RE., JONES SL. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.* 2001, 13, 117-122.

WATERS WR., NONNECKE BJ., OLSEN SC., PALMER MV. Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon-gamma responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Vet. Microbiol.*. 2007, 119, 277-282.

WATERS WR., BUDDLE BM., VORDERMEIER HM., GORMLEY E., PALMER MV., THACKER TC., et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 2011, 18, 1882-1888.

WALRAVENS K., ALLIX C., SUPPLY P., RIGOUTS., GODFROID J., GOVAERTS M., et al. Dix années d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose bovine en Belgique. *Epidémiologie Santé Anim.*. 2006, 49, 103-111.

Wood et al., WOOD PR., CORNER LA., PLACKETT P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res. Vet. Sci.*. 1990a, 49, 46-49.

WOOD PR., ROTHEL JS., MCWATERS PG., JONES SL. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. *Vet. Immunol. Immunopathol.*. 1990b, 25, 37-46.

WOOD PR., JONES SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberc. Edinb. Scotl.*. 2001, 81, 147-155.

WADHWA A., HICKLING GJ., EDA S. Opportunities for improved serodiagnosis of human tuberculosis, bovine tuberculosis, and paratuberculosis. *Vet. Med. Int.*. 2012, 2012, 674238.

WHELAN AO., COAD M., PECK Z a. A., CLIFFORD D., HEWINSON RG., VORDERMEIER HM. Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.*. 2004, 155, 204-206.

## **Le résumé court :**

Bien qu'officiellement indemne vis-à-vis de la tuberculose bovine depuis plus de dix ans, la France n'est pas encore parvenue à éradiquer cette maladie infectieuse de son territoire. En outre, la persistance de la maladie, corrélée à sa recrudescence dans certaines régions, menace le maintien du statut officiellement indemne dans certaines zones. Actuellement, le système français de contrôle de la tuberculose bovine recourt toujours aux tests cutanés, qui constituent la seule technique de dépistage en élevage reconnue réglementairement au sein de l'Union Européenne. Les tests cutanés présentent des imperfections quant à leurs caractéristiques intrinsèques et à leur réalisation pratique. Par ailleurs, les schémas décisionnels actuels imposent un blocage de 42 jours dans les troupeaux suspects, avant de pouvoir les soumettre à une intradermotuberculination comparative de recontrôle, ce qui engendre des pertes économiques importantes et une démotivation des acteurs de terrain.

Un protocole de dépistage expérimental a été mis en œuvre en France durant deux campagnes de prophylaxie (entre 2013 et 2015) dans le but d'évaluer si le dosage de l'interféron gamma sur un prélèvement de sang effectué à J3 pourrait remplacer les tests cutanés employés en recontrôle à 42 jours lorsque le premier test (réalisé à J0) était non négatif. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était de mesurer l'impact de la tuberculine injectée à l'occasion du test cutané à J0 sur les résultats du test interféron gamma réalisé à J3.

L'analyse statistique des données collectées lors de ces deux campagnes de prophylaxie a permis d'établir que la sensibilité du test IFN réalisé entre 3 et 8 jours (96,0 % [81,0% ; 99,0%] IC 95%) était significativement supérieure à celle de l'IDT de recontrôle effectuée à 42 jours (50,0 % [32,0% ; 68,0%] IC 95%). En revanche, la spécificité de l'IDT de recontrôle à 42 jours (88,6 % [86,3% ; 96,6%] IC 95%) était meilleure que celle du test IFN réalisé entre 3 et 8 jours (47,5 % [44,1% ; 50,9 %] IC 95%).

Chez les animaux infectés, nous n'avons pas observé de modifications de la réponse IFN suite à une injection de tuberculine. En revanche, chez les animaux indemnes, les résultats semblent suggérer un effet stimulant de l'injection de tuberculine sur le résultat du test interféron. Cet effet a été mis en évidence de manière quantitative sur les ratios de densité optique calculés et de manière qualitative sur les résultats d'IFN interprétés sur la base du Bovigam seul. Lorsque l'IFN est interprété à l'aide du Bovigam et du MIX, en revanche, cet effet ne semble pas se répercuter sur le résultat final du test IFN. Par ailleurs, pour tous les animaux indemnes, la réponse IFN était plus élevée lors du test réalisé à J3 qu'à J42, que le test ait été précédé d'une injection de tuberculine ou non. Ceci peut être mis en lien avec l'existence de réactions croisées. Dans tous les cas, il semble nécessaire de confirmer les résultats obtenus expérimentalement, afin de prendre en compte d'éventuels facteurs intercurrents. Le schéma associant en série une IDT et un IFN n'engendre par conséquent pas de risque de sous-détection des animaux infectés et ne menace donc pas le commerce européen. Il est cependant moins spécifique que le schéma actuellement recommandé par l'Union Européenne et devrait être réservé aux élevages pour lesquels l'impact économique d'un blocage de 42 jours est particulièrement lourd.

### **Mots clés :**

TUBERCULOSE BOVINE, DEPISTAGE, TESTS CUTANES, INTERFÉRON GAMMA, MYCOBACTERIUM BOVIS, SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ.

## **The short abstract:**

Although officially bovine tuberculosis free for over ten years, France has not yet managed to eradicate this infectious disease from its territory. Moreover, the persistence of this disease correlated to its resurgence in some areas is threatening the officially free status of the country. Currently, screening tests used to detect bovine tuberculosis in French farms are skin tests, which are the only screening tests recommended within the European Union. Skin tests are not perfectly sensitive nor specific and are difficult to perform correctly. Moreover, the current decision schemes impose a 42 days blocking in suspect herds, before subjecting cattle to a retest with a single intradermal cervical comparative tuberculin test (SICCT), leading to significant economic losses and demotivation of breeders, veterinarians and veterinary officers.

An experimental screening protocol has been implemented in France for two prophylaxis campaigns (between 2013 and 2015) in order to assess whether the dosage of interferon gamma on a blood sample taken on Day3 could replace skin tests employed for 42 days rechecking when the first test (performed on Day0) was not negative. The objective of this study was to measure the impact of tuberculin injected for the skin test on Day0 on the results of gamma interferon test performed on Day3.

Statistical analysis of the data collected during these two prophylaxis campaigns has revealed that the sensitivity of the IFN achieved between 3 and 8 days (96,0% [81,0%; 99,0%] 95% CI) was significantly greater than that of the skin test retest on day 42 (50,0% [32,0%; 68,0%] 95% CI). However, the specificity of the skin test retest (88,6% [86,3%, 96,6%] 95% CI) was higher than that of the IFN test performed between 3 and 8 days (47,5% [61,1%; 67,7%] 95%).

Among infected animals, we did not observe any change in the IFN response following an injection of tuberculin. In contrast, in free animals, a possible stimulating effect of the injection of tuberculin on the outcome of the interferon test performed 3 days later was demonstrated. The scheme combining in series a skin test and an IFN test engenders therefore no risk of under-detection of infected animals and thus does not threaten European trade. It is however less specific than the scheme currently recommended by the European Union and should be reserved for farms where the economic impact of a 42 day lock is particularly heavy.

### **Keywords:**

BOVINE TUBERCULOSIS, SCREENING, SKIN TESTS, INTERFERON GAMMA, MYCOBACTERIUM BOVIS, SENSITIVITY, SPECIFICITY.

## Le résumé long

### 1. Généralités

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse, d'évolution chronique, transmissible à de nombreux mammifères dont l'homme, liée à la présence d'une bactérie qui va engendrer différentes lésions au sein de nombreux organes. Elle est due principalement à une bactérie appelée *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) et parfois à *M. tuberculosis* (LoBue *et al.*, 2010). Elle provoque une détérioration de l'état général et, à terme, entraîne la mort. Les nodules, encore appelés "tubercules" se forment au niveau des organes des animaux atteints, d'où le nom « tuberculose » (OIE, 2010d ; Bénet et Praud, 2011). La tuberculose bovine (TB) est un fléau majeur de l'élevage bovin en zone infectée. Elle représentait un problème de santé publique majeure en Europe (avant la mise en place des mesures de contrôle). Sur le plan économique, en plus des pertes en viande et en lait, elle entrave le commerce intérieur et extérieur (Bénet et Praud, 2011). Bien qu'officiellement indemne vis-à-vis de la tuberculose bovine depuis plus de dix ans, la France n'est pas parvenue à éradiquer cette maladie infectieuse de son territoire. En outre, la persistance de la maladie, corrélée à sa recrudescence dans certaines régions, menace le maintien du statut officiellement indemne dans certaines zones.

La lutte contre la tuberculose bovine se base essentiellement sur le dépistage et l'élimination des animaux atteints. Il existe plusieurs méthodes de dépistage, l'intradermotuberculation (simple ou comparative) qui est un test cutané, et plus récemment le test d'interféron qui est un test sanguin.

L'intradermotuberculation (IDT) : Dans le cas d'une IDT simple (IDS), on réalise à J0 une injection intradermique d'une dose unique de tuberculine bovine extraite à partir de culture de *M. bovis* au niveau de l'encolure du bovin, puis on évalue à J3 (72 heures) la réaction obtenue au point d'inoculation. L'IDT comparative (IDC) nécessite l'utilisation de deux tuberculines différentes : la tuberculine aviaire extraite à partir de *M. avium* et la tuberculine bovine extraite à partir de *M. bovis*. Espacées de 10 à 15 cm, les deux tuberculines sont injectées au niveau de l'encolure du bovin, l'une crânialement (*M. avium*) et l'autre caudalement (*M. bovis*). La lecture se réalise à J3 (J0 correspondant au jour de l'injection des tuberculines) et consiste à comparer la réaction de l'animal lors de l'injection de tuberculine bovine, à la réaction provoquée par l'injection de tuberculine aviaire pratiquée simultanément.

Le dosage de l'interféron gamma (IFN) : L'IFN est une interleukine impliquée dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Lors d'infection bactérienne à *M. bovis*, les interférons gamma sont synthétisés par les cellules du système immunitaire (SI) (C. M. Robinson *et al.*, 2012 ; McGill *et al.*, 2014). Le test de dosage de l'IFN est un test sanguin permettant d'évaluer *in vitro* la réactivité des lymphocytes T circulants stimulés par un antigène tuberculeux. Dans un premier temps, le sang total (recueilli sur tube hépariné) est réparti en trois échantillons mis en incubation pendant 18 à 24 heures avec des antigènes de *M. bovis* ou des antigènes de *M. avium* (pour effectuer une stimulation comparée), ou aucun antigène (témoin négatif). Dans second temps, la mesure de la quantité d'IFN libérée dans le plasma est réalisée par une méthode immuno-enzymatique dite ELISA en « sandwich » utilisant des anticorps monoclonaux anti-IFN $\gamma$  (Rothel *et al.*, 1990 ; Wood *et al.*, 1990a, 1990b ; Wood et Jones, 2001).

### 2. Contexte

L'obstacle majeur pour l'éradication de la maladie réside dans la difficulté à la diagnostiquer. La lutte contre la tuberculose bovine repose essentiellement sur le dépistage et l'élimination des animaux atteints. Les tests cutanés (IDT) sont les seules techniques reconnues règlementairement au sein de l'Union Européenne. Or ces tests cutanés présentent de nombreux inconvénients et leurs sensibilités et spécificités sont imparfaites. Par ailleurs, les protocoles actuels imposent le blocage durant 6 semaines des troupeaux considérés comme suspects suite à l'obtention de résultats non négatifs au dépistage afin de conduire des investigations complémentaires, ce qui pose un problème économique considérable en cas de résultats faussement positifs. Dans le cadre du dépistage systématique de la tuberculose bovine en élevage et afin de pouvoir étudier la possibilité de remplacer l'IDC réalisée 42 jours après l'obtention d'un résultat non négatif à l'IDS par un dosage d'interféron gamma (IFN) juste après la lecture de l'IDS, le protocole expérimental national IFN a été mis en place. Son objectif premier était d'étudier si ce dosage de l'IFN pratiqué le jour de la lecture des résultats de l'IDS (J3) était au moins aussi sensible que l'IDC de recontrôle à J42 recommandée par la réglementation européenne (Directive CE 64/432). Un objectif secondaire était de déterminer si l'injection de tuberculine réalisée à J0 influe ou non sur le résultat du test IFN réalisé à J3, ce qui constitue l'objectif majeur de notre travail

de stage. Ce protocole a été mis en œuvre par la DGAI, en partenariat avec l'ANSES et était suivi par la plateforme nationale d'épidémiologie en santé animale (Plateforme ESA) qui a assuré la mise en œuvre de l'expérimentation et la collecte des résultats. L'unité EpiMAI (Epidémiologie des Maladies Animales Infectieuses) de l'ENVA (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort) était chargée de l'analyse des données.

### **3. Matériel et méthodes :**

Le protocole expérimental s'est étendu sur une durée de deux campagnes de prophylaxie consécutives de 2013 à 2015, pour permettre de collecter suffisamment de données afin de disposer d'une puissance statistique adéquate. L'étude a été menée sur l'ensemble du territoire national continental pour les animaux répondant aux critères d'inclusion. Dix départements ont pu être inclus dans le dispositif à savoir les Ardennes, l'Ariège, la Charente, la Côte-d'Or, la Dordogne, Lot-et-Garonne, les Pyrénées-Atlantiques, les Hautes-Pyrénées, Tarn et la Haute Vienne.

Cas particulier des élevages en suivi renforcé (SR) : Dans les bases de données brutes (2013-2014 et 2014-2015) reçues pour les analyses, certains enregistrements en provenance de Dordogne concernaient des animaux provenant d'élevages en « suivi renforcé » (SR), c'est-à-dire qui se trouvaient dans un contexte épidémiologique à risque vis-à-vis de la tuberculose bovine. Les animaux en SR ne respectaient pas forcément le premier critère d'inclusion du protocole expérimental, à savoir l'obtention de résultats non-négatifs à l'IDT initiale. En effet, ces bovins en SR ont été soumis aux tests de façon systématique, quel que soit leur résultat à la première IDT de dépistage. Une caractéristique essentielle de ces animaux en SR était le fait que la prise de sang pour le premier test IFN était faite le même jour que l'IDT (et non cinq à huit jours plus tard, ce qui était le cas pour les animaux inclus dans le protocole), ce qui suggère que les résultats du premier IFN des animaux en SR n'étaient pas modifiés par la tuberculination.

Pour les deux campagnes de prophylaxie étudiées (2013-2014 / 2014-2015), la base de données contenait 18267 lignes de résultats, correspondant à 13222 animaux. Afin de garantir la cohérence des analyses, l'échantillon qui a pu être étudié comportait 1087 animaux indemnes (780 inclus dans le cadre du protocole, et 307 animaux en SR) et 33 animaux infectés (17 animaux inclus dans le protocole et 16 en SR) (n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques les animaux pour lesquels les délais entre la réalisation des tests intradermiques et de l'IFN étaient aberrants, les animaux pour lesquels les dates de réalisation des tests n'étaient pas renseignées...).

#### **Réalisation des tests cutanés**

A J0 : Réalisation des tests d'IDT (IDS ou IDC selon les départements) et d'une prise de sang pour les tests d'interféron (pour les animaux en SR)

A J3-J8 : Les prises de sang étaient pratiquées dans les cinq jours qui suivaient la lecture d'un résultat non-négatif en intradermotuberculination donc entre J3 et J8.

A J42 : Le second test d'IDT devait être obligatoirement une IDC. Elle était effectuée le même jour que la prise de sang pour le dosage de l'IFN, au minimum à 42 jours et au maximum à 52 jours après la première IDT.

#### **Analyses statistiques**

Les sensibilités des tests ont été calculées chez les animaux infectés et les spécificités ont été calculées chez les animaux indemnes. Nous avons conservé pour les analyses tous les animaux dont le résultat était non négatif à l'IDT1 afin de constituer un échantillon homogène quel que soit le motif d'intégration des animaux à la base de données (protocole ou SR), tout en conservant le plus grand nombre possible d'animaux. Les sensibilités et les spécificités calculées sont donc conditionnelles à l'obtention d'un résultat non négatif à l'IDT.

L'effet de l'intradermotuberculination sur les résultats du dosage d'interféron gamma réalisé dans les 3 à 8 jours suivants a été étudié de deux manières :

Approche dite "qualitative" : dans laquelle on s'intéressait aux résultats qualitatifs (négatif ou non-négatif) des tests IFN. Après avoir étudié la répartition des animaux suivant leurs combinaisons de résultats aux quatre tests (IDT1, IDT2, IFN1 et IFN2) et sélectionné les animaux dont les résultats aux tests cutanés réalisés à J0 et à J42 étaient identiques (pour garantir que le statut immunitaire des

animaux évolue peu), nous avons comparé les pourcentages des animaux réagissant au test IFN1 à celui des animaux réagissant au test IFN2 (test de Mc Nemar sur échantillons appariés) de façon à mettre en évidence ou non, un effet de la tuberculine injectée à l'occasion de l'IDT1 sur les résultats des tests IFN. Comme la succession des tests n'était pas la même chez les animaux en SR et chez ceux entrés dans le protocole, leurs résultats ont été analysés séparément et les animaux intégrés en SR ont pu servir de référence puisqu'aucun des tests IFN qu'ils avaient subis n'était précédé d'une IDT.

Approche dite "quantitative" : dans cette approche, on s'intéressait à la quantité d'IFN produite mesurée par spectrophotométrie. En France, les résultats de dosage de l'interféron gamma sont fournis sous la forme d'une proportion de DO (rapportée aux résultats de DO fournis par les témoins négatif TN et positif TP) et non d'une DO brute. Il s'agit donc d'un pourcentage de densité optique globale qui prend en compte la réaction due aux Mycobactéries aviaires et nivelle les variations éventuelles dues aux réactifs fournis dans les kits commercialisés. Ce type d'interprétation constitue une spécificité française. Dans les autres pays européens, l'interprétation du résultat est basée sur la DO brute. Le principe de cette partie est fondé sur la comparaison, grâce aux tests t de Student et aux tests de Wilcoxon sur séries appariées, des ratios des densités optiques en réponse aux PPDA, PPDB et MIX afin d'étudier les variations de la réponse immunitaire des animaux selon qu'ils avaient ou non subi une tuberculination avant l'IFN. Comme précédemment, l'analyse a été conduite séparément chez les animaux inclus dans le cadre de protocole et chez les animaux inclus en SR (type d'inclusion différent).

## **4. Résultats**

### **4.1. Caractéristiques des tests de dosage de l'interféron gamma**

L'analyse statistique des données collectées lors de ces deux campagnes de prophylaxie a permis d'établir que la sensibilité du test IFN réalisé entre 3 et 8 jours (96,0 % [81,0% ; 99,0%] IC 95%) est significativement supérieure (Test de Mc Nemar,  $p = 0,003$ ) à celle de l'IDT de reconrôle (50,0 % [32,0% ; 68,0%] IC 95%). En revanche, la spécificité de l'IDT de reconrôle (88,6 % [86,3% ; 96,6%] IC 95%) était meilleure (Test de Mc Nemar,  $p = 2,36 \times 10^{-61}$ ) que celle du test IFN réalisé entre 3 et 8 jours (47,5 % [44,1% ; 50,9 %] IC 95%).

### **4.2. Effet de l'intradermotuberculination sur les résultats des tests IFN**

#### **4.2.1. Approche qualitative**

Pour les animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole, nous avons observé que le pourcentage des animaux ayant obtenu des résultats non-négatifs à l'IFN1 n'était pas significativement différent (Test de Mc Nemar,  $p = 0,46$ ) du pourcentage des animaux non-négatifs à l'IFN2. Cependant, les analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul (l'UE européenne recommande l'utilisation du test Bovigam seul, c'est-à-dire la PPD aviaire et la PPD bovine sans rajouter le MIX) ont montré que cette différence était significative (Test de Mc Nemar,  $p = 0,04$ ). Concernant les animaux indemnes en SR, le pourcentage des animaux à résultat non-négatif à l'IFN1 était significativement différent (test de Mc Nemar,  $p = 1,28 \times 10^{-17}$ ) du pourcentage des animaux non-négatifs à l'IFN2. Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul chez ces animaux en SR : Le pourcentage des animaux à résultat non-négatif à l'IFN1 était significativement différent (test de Mc Nemar,  $p = 1,75 \times 10^{-11}$ ) du pourcentage des animaux non-négatifs à l'IFN2.

Pour les animaux infectés, nous avons observé chez ceux inclus dans le protocole que les pourcentages des animaux non-négatifs aux tests IFN1 et 2 sont quasiment identiques (test de Mc Nemar,  $p = 1$ ). Et chez ceux inclus en SR, tous les animaux ont fourni un résultat non-négatif aux deux tests IFN. Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul. Il est néanmoins important de considérer la petite taille de l'échantillon et la faible puissance statistique qui en découle.

#### **4.2.2. Approche quantitative**

Concernant les animaux indemnes, on a observé une diminution globale des densités optiques entre le premier et le second test. Chez les animaux indemnes inclus dans le cadre du protocole, la production médiane d'IFN suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente, selon l'existence d'une injection préalable (J3) ou non (J42) (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,38 \times 10^{-10}$ ). Il en était de même concernant le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 7,37 \times 10^{-05}$ ). Avec la PPD aviaire en revanche, la différence n'était pas significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,06$ ). La réponse en termes de densité optique était plus importante à J3 qu'à J42, et ce,

dans tous les cas. Par ailleurs, chez les animaux indemnes en SR, La différence était non significative pour la PPD aviaire (test de Student pour séries appariées,  $p = 0,28$ ). En revanche, la production médiane d'interféron suite à la stimulation par la PPD bovine était significativement différente entre J3 et J42 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 1,02 \times 10^{-10}$ ). Il en était de même pour les moyennes obtenues avec le MIX (test de Student pour série appariées,  $p = 0,001$ ). Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul.

Pour les animaux infectés inclus dans le protocole, On a pu noter une diminution globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test. Le test de Wilcoxon pour échantillons appariés (taille de notre effectif  $< 30$ ) nous a permis de conclure que les médianes de la production d'interféron suite à la stimulation par la PPD aviaire et par la PPD bovine n'étaient pas significativement différentes (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,22$  et  $p = 0,14$ ). Pour le MIX, cette différence était significative (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,005$ ). En revanche, chez les animaux infectés en SR, on a pu noter une augmentation globale des médianes des densités optiques entre le premier et le second test. Cependant, la production d'IFN médiane suite à la stimulation par la PPD aviaire n'était pas significativement différente, entre l'IFN1 et l'IFN2 (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,22$ ). Il en était de même pour le MIX (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,57$ ). Par contre, cette différence était significative concernant la PPD bovine (test de Wilcoxon pour séries appariées,  $p = 0,03$ ). Ces mêmes résultats ont été obtenus à partir des analyses faites sur les résultats du test Bovigam seul.

**L'étude a été menée sur l'ensemble du territoire national continental pour les animaux répondant aux critères d'inclusion. Dix départements ont pu être inclus dans le dispositif car dans le reste des départements français, la prophylaxie de la tuberculose bovine en élevage a été totalement arrêtée dans 60 départements. Par conséquent, pour ceux-là l'inclusion des animaux dans l'étude était impossible. Il est néanmoins impératif de rappeler que le nombre final d'animaux dont l'infection tuberculeuse a pu être confirmée avec certitude n'est pas très élevé ce qui engendrait un manque de puissance statistique. Par ailleurs, l'incitation des éleveurs à rentrer dans le dispositif expérimental était très variable d'un département à l'autre, selon le contexte (moyens humains disponibles à la DDPP, historique de la tuberculose dans le département, présence ou non d'un laboratoire agréé pour l'IFN à proximité ...) et l'inclusion des animaux dans le protocole expérimental était basée sur le volontariat, on peut donc suspecter que ce type d'inclusion puisse influencer les résultats obtenus. Cependant, la majeure partie des enregistrements provient de Côte-d'Or et de Dordogne, où le volontariat n'influe pas sur l'intégration des éleveurs dans le protocole. Ont été exclus du protocole tous les troupeaux où la contention des bovins n'était pas optimale pour une lecture adéquate des tuberculinations (taureaux de combat par exemple), les troupeaux classés à risque administratif, les élevages dont le vétérinaire sanitaire refuse de suivre la formation relative à la tuberculination ou de se soumettre à des mesures de supervision de la part de la DDecPP et enfin les établissements de quarantaine et de collecte de semence pour les inséminations artificielles. L'inférence est donc impossible à l'ensemble des bovins français. Mais elle paraît tout à fait possible aux bovins des départements les plus concernés par la tuberculose bovine et ayant obtenu des résultats non négatifs à une IDT en prophylaxie, à condition que les méthodes de travail de l'éleveur et du vétérinaire soient satisfaisantes.**

**Au final, notre étude nous a permis de conclure que le test IFN1 est plus sensible que l'IDT de reconrôle ce qui signifie, a priori, qu'il n'y a pas de risque de sous-détection des animaux atteints de tuberculose, et donc pas de risque pour le commerce des bovins, notamment le commerce au niveau de l'union européenne. Nous avons également pu mettre en évidence qu'il n'y avait pas d'effet désensibilisant de la tuberculine injectée lors de l'IDT1 sur les résultats de l'IFN1 réalisée quelques jours après, ce qui pourrait faire du test IFN une alternative à l'IDC permettant de s'affranchir du délai d'attente de six semaines qu'il faut respecter entre deux IDT lorsque la première IDT s'avère non-négative. Cependant, la spécificité de l'IFN1 est médiocre, ce qui augmenterait les chances de passer à côté des animaux réellement indemnes. Si ce protocole IDT-IFN est accepté par l'UE, il faudrait le réserver à certains types d'élevages, pour lesquels le blocage de 42 jours engendre un impact économique tel qu'il serait préférable de retester par l'IFN sans attendre, quitte à augmenter le nombre d'abattages diagnostiques.**