

VACCINATION ANTI-BRUCELLIQUE DU BOUQUETIN DES ALPES (*CAPRA IBEX*), UNE OPTION POUR L'ASSAINISSEMENT DU MASSIF DU BARGY ? *

COMPARAISON DU NIVEAU D'INNOCUITÉ CONJONCTIVALE DU VACCIN REV.1 CHEZ LE BOUQUETIN DES ALPES ET LA CHÈVRE DOMESTIQUE (*C. HIRCUS*)

Ponsart Claire¹, Garin-Bastuji Bruno², Riou Mickaël³, Locatelli Yann⁴, Fadeau Alain⁵, Jaÿ Maryne¹,
Jacques Isabelle^{6,7}, Simon Roland⁴, Perrot Ludivine¹, Freddi Luca¹, Breton Sylvain³,
Chaumeil Thierry³, Blanc Barbara⁴, Ortiz Katia⁴, Rioult Damien⁸, Quemere Erwan⁹,
Sarradin Pierre³, Chollet Jean-Yves¹⁰ et Rossi Sophie¹⁰



RÉSUMÉ

Rev.1 est un vaccin vivant atténué stable, ayant permis dans de nombreux pays, une réduction significative de l'incidence de la brucellose à *Brucella melitensis*, à la condition d'une couverture suffisante des populations ovines et caprines. Dans le cadre de la gestion du foyer de brucellose chez les bouquetins du Bargy, une expérimentation visant à comparer l'innocuité du vaccin Rev.1 conjonctival entre la chèvre domestique et le bouquetin des Alpes a été entreprise au printemps 2017. Au total 24 animaux adultes ont été inclus dans l'étude, répartis en deux lots de 6 mâles et deux lots de 6 femelles non gestantes de chaque espèce, puis suivis pendant une période de 45 ou 90 jours. Le vaccin Rev.1 a entraîné une réponse humorale chez tous les animaux vaccinés, avec une intensité supérieure chez les bouquetins. Contrairement à ce que la proximité génétique entre chèvre et bouquetin pouvait laisser penser, la distribution de la souche Rev.1 au sein des organes ainsi que le risque d'excrétion urogénitale ont été beaucoup plus élevés chez le bouquetin que chez la chèvre, tous âges et sexes confondus. Ce risque s'est concrétisé par la transmission de la souche vaccinale de bouquetins vaccinés à un animal témoin non vacciné. Ces travaux mettent en évidence une capacité moindre du bouquetin à contenir la diffusion, la multiplication et l'excrétion du vaccin Rev.1, suggérant un risque plus important de diffusion de cette souche vaccinale chez cette espèce sauvage. En nature, une diffusion non maîtrisée de la souche vaccinale pourrait compromettre la surveillance et la gestion du foyer, en induisant des séroconversions impossibles à distinguer entre animaux infectés par les souches sauvage et vaccinale.

Mots-clés : brucellose, Bouquetin des Alpes, Chèvre, vaccin Rev.1, expérimentation, innocuité, excrétion.

.../..

* Texte de la conférence présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA, 30 mai 2018

¹ Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, LNR Brucellose, 94701 Maisons-Alfort, France

² 2Anses, Direction des affaires européennes et internationales, 94701 Maisons-Alfort, France

³ Inra, UE-1277 Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE), 37380 Nouzilly, France

⁴ MNHN, Réserve zoologique de la Haute Touche, 36290 Obterre, France

⁵ Laboratoire de Touraine, 37210 Parçay-Meslay, France

⁶ Inra, Université de Tours, UMR-1282 Infectiologie et santé publique (ISP), 37380 Nouzilly, France

⁷ IUT Tours, Département génie biologique, Tours, France

⁸ Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH, Unité SEBIO, Reims, France

⁹ Inra, Unité Comportement et écologie de la faune sauvage (CEFS), Castanet-Tolosan, France

¹⁰ ONCFS, Unité sanitaire de la Faune, Direction de la recherche et de l'expertise, 78612 Le Perray-en-Yvelines, France

.../..

ABSTRACT

*Rev.1 is a stable live attenuated vaccine, which has significantly contributed to reduce the incidence of brucellosis due to *Brucella melitensis* in many countries, provided a sufficient coverage of sheep and goat populations was achieved. As regards the control of the brucellosis outbreak in Alpine ibex, an experiment to compare the safety of conjunctival Rev.1 vaccination between domestic goats and Alpine ibex was undertaken in spring 2017. Twenty-four adult animals were included in the study, divided into two batches of 6 males and two batches of 6 non-pregnant females of each species, for a period of 45 or 90 days. The Rev.1 vaccine resulted in a humoral response in all vaccinated animals, with a higher intensity in ibex compared to goats, regardless of age and sex. The risk resulted in the Rev.1 transmission from vaccinated ibex to one control animal. Despite what the genetic proximity between goat and ibex might suggest, the distribution of Rev.1 in organs and the risk of urogenital excretion were much more marked in ibex than in goats, all ages and sexes combined. These results highlight a reduced ability of Alpine ibex to contain the spread, multiplication and excretion of Rev.1 vaccine, suggesting a risk of spread of the vaccine strain in the ibex population. In nature, the uncontrolled diffusion of the vaccine strain may impair surveillance and management of this outbreak, inducing seroconversions of animals, without difference between animals infected from wild and vaccine strains.*

Keywords: *Brucellosis, Alpine Ibex, Goat, Rev.1 vaccine, Experimentation, Innocuousness, Shedding.*

**I - INTRODUCTION**

1 À la suite de la survenue de cas de brucelloses
2 humaines et bovines en 2012 en Haute-Savoie
3 [Mailles *et al.*, 2012 ; Garin-Bastuji *et al.*, 2014 ;
4 Mick *et al.*, 2014], une enquête de terrain conduite
5 par l'Office national de la chasse et de la faune
6 sauvage (ONCFS) a révélé que la population de
7 bouquetins des Alpes (*Capra ibex*) du massif du
8 Bargy est un réservoir de brucellose
9 (séroprévalence moyenne ~40 %), et est sans doute
10 à l'origine de la réémergence de cette maladie
11 éradiquée des troupeaux domestiques depuis les
12 années 2000 [EFSA, 2014 ; Hars *et al.*, 2015]. À l

13 a suite de cette découverte, des mesures d'abattage
14 ciblé (animaux séropositifs ou cliniquement
15 atteints) et massif (2013 et 2015) ont été conduites
16 sous réquisition préfectorale. Ces abattages ont
17 abaissé de moitié la taille de la population de
18 bouquetins [Marchand *et al.*, 2017]. Toutefois, ces
19 mesures n'ont pas conduit à une diminution
20 immédiate de la séroprévalence, ce qui a posé la
21 question de l'acceptabilité de ces abattages
22 appliqués à une espèce protégée [Hars *et al.*, 2015].

23 Dans son avis de 2015 relatif à la gestion de la
24 brucellose des bouquetins du Bargy, l'Agence
25 nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de

26 l'environnement et du travail (Anses) a évoqué la
27 vaccination des bouquetins comme une piste
28 sérieuse de gestion, en complément d'abattages
29 ciblés et/ou massifs [Anses, 2015]. À la suite de ce
30 rapport, le ministère chargé de l'agriculture a
31 sollicité un appui scientifique et technique auprès
32 de l'Anses et de l'ONCFS, visant à définir et évaluer
33 les critères préalables à une approche vaccinale
34 contre la brucellose chez les bouquetins du massif
35 [Anses et ONCFS, 2016]. Ce rapport concluait que le
36 principal critère à vérifier en amont d'une
37 vaccination des bouquetins en nature est
38 l'innocuité du vaccin vivant (souche *Brucella*
39 *melitensis* « Rev.1 ») dans cette espèce.

40 L'objectif de cet article est de présenter

- 41 1. les principes de la vaccination anti-brucellique,
42 ses avantages et inconvénients et
- 43 2. les principaux résultats de l'expérimentation
44 menée conjointement par le Muséum national
45 d'histoire naturelle (MNHN), l'Anses, l'Inra et
46 l'ONCFS en 2017 afin de comparer le niveau
47 d'innocuité du vaccin Rev.1 conjonctival chez le
48 bouquetin des Alpes et la chèvre domestique.

II-VACCINATION ANTI-BRUCELLIQUE : PRINCIPES ET LIMITES

1. PRINCIPES DE LA VACCINATION AVEC LA SOUCHE REV.1

Les bactéries du genre *Brucella* sont des agents pour la plupart zoonotiques, touchant un grand nombre de mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins, porcins, etc.) ou sauvages (ruminants et suidés notamment ; Pappas, 2010 ; Godfroid *et al.*, 2013). *Brucella melitensis* est l'espèce de *Brucella* qui infecte principalement les petits ruminants, mais qui peut également être transmise aux bovins et camélidés [Verger, 1985 ; Alton, 1987 ; Bosseray, 1991].

La brucellose des petits ruminants est enzootique dans de nombreux pays [Pappas, 2010 ; Rossetti *et al.*, 2017]. Dans la plupart des espèces sensibles, les *Brucella* induisent des troubles de l'appareil reproducteur (avortements, produits chétifs chez les femelles, orchites et épидидymites chez les mâles), et parfois des arthrites, dans les deux sexes. Les avortements ou mises-bas infectieuses conduisent à l'expulsion de placentas ou à l'excrétion de sécrétions génitales contaminées, à l'origine de contaminations animales et humaines par contact direct ou indirect (aérosols infectieux notamment). Le lait de femelles infectées est également très souvent contaminé et à l'origine d'infections d'origine alimentaire, chez l'Homme notamment [Papademas, 2000]. La prévention des avortements joue donc un rôle majeur dans le contrôle de la maladie. La vaccination des petits ruminants par la souche vaccinale *Brucella melitensis* Rev.1, est un moyen permettant d'atteindre cet objectif dans le cheptel domestique [Blasco, 1997].

Reconnu comme le meilleur vaccin disponible actuellement pour la prévention de la brucellose chez les petits ruminants, notamment lorsqu'il est utilisé à dose standard ($0,5-2 \times 10^9$) par voie conjonctivale, le vaccin Rev.1 induit une réduction significative des avortements brucelliques et du niveau d'excrétion de la bactérie par voie génitale dans les populations animales vaccinées massivement avant infection [Blasco, 1997 ; Blasco et Molina-Flores, 2011].

La souche Rev.1 est une *Brucella melitensis* à virulence atténuée stable [Elberg et Faunce, 1957]. C'est une souche mutante réverse non-dépendante de la streptomycine isolée à partir d'une souche virulente. L'immunogénicité de cette souche atténuée, comme pour la souche B19 utilisée chez

les bovins, est conditionnée par son aptitude à se multiplier chez l'hôte vacciné et à coloniser, au moins pendant une période limitée, différents tissus lymphoréticulaires (en premier lieu, les nœuds lymphatiques cibles drainant le site d'administration du vaccin avant distribution éventuelle à d'autres sites plus distants mais sans coloniser durablement les organes génitaux) [Muñoz *et al.*, 2008]. Elle a ainsi la capacité de persister suffisamment chez l'hôte pour permettre à celui-ci de développer une réponse immunitaire durable, de type cellulaire principalement. La stabilité de l'atténuation de cette souche a été largement démontrée aussi bien expérimentalement que lors de l'utilisation du vaccin sur le terrain [Elberg, 1981, 1996]. Cette souche vaccinale a tout d'abord été administrée aux petits ruminants par voie sous-cutanée. Il a notamment été montré que la protection vis-à-vis d'une épreuve avec une souche virulente de *B. melitensis* obtenue par vaccination de chèvres âgées de 3 à 7 mois conférait une protection d'au minimum 4,5 ans [Alton, 1987]. L'utilisation de la souche Rev.1 sur le terrain à dose standard a permis, dans de nombreux pays, d'obtenir une réduction significative de l'incidence de la brucellose à *B. melitensis* aussi bien chez les petits ruminants que chez l'Homme [Elberg, 1981, 1996] ainsi qu'une diminution des taux d'avortements. Ces effets ne sont observés significativement qu'à la condition d'une couverture d'au moins 80 % des populations animales et ceci, soit par vaccination de masse quel que soit l'âge, soit par vaccination des jeunes animaux impubères (3-6 mois) associée à une prophylaxie sanitaire de type test-abattage ciblé chez les adultes séropositifs (considérés comme infectés [Blasco, 1997]). Le choix de la vaccination d'animaux jeunes est lié aux inconvénients de la vaccination par Rev.1, avec, entre autres, la persistance pendant plusieurs mois d'une sérologie positive chez les animaux vaccinés après la puberté et la possibilité d'avortements induits lors de vaccination d'animaux gestants [Zundel *et al.*, 1992].

La voie conjonctivale a été développée dans le but de réduire la durée de production d'anticorps vaccinaux. Expérimentalement, la vaccination Rev.1 à dose standard par voie conjonctivale induit une réponse sérologique inférieure à 4 mois, tant chez la chèvre que chez la brebis vaccinée entre 3 et 6 mois d'âge [Fensterbank *et al.*, 1985, 1987] alors que la vaccination sous-cutanée induit une réponse

détectable pendant au moins 6 mois voire plusieurs années chez certains animaux. Ces résultats sont confirmés régulièrement dans les pays utilisant une stratégie de vaccination conjonctivale des animaux impubères [Stournara *et al.*, 2007].

Le vaccin Rev.1 administré par voie sous-cutanée ou conjonctivale à dose standard a été utilisé avec succès dans de nombreux pays (France, Espagne, Italie, Grèce, Portugal, Israël, Maroc, Mongolie, Tunisie, Turquie, notamment) que ce soit chez le jeune ou chez l'adulte [Banaï, 2002 ; Blasco, 1997 et 2011]. Les stratégies adoptées pour le contrôle de la brucellose ont été variables selon les pays. Toutefois, la stratégie la plus efficace dans le cas de régions où la prévalence de l'infection est élevée et où le mode d'élevage est extensif ou nomade, est la vaccination d'animaux jeunes et adultes par voie conjonctivale [Blasco, 1997].

2. LIMITES DE LA VACCINATION AVEC LA SOUCHE REV.1

2.1 INTERFÉRENCES SÉROLOGIQUES

Un inconvénient reconnu de la souche vaccinale Rev.1 est d'induire la production d'anticorps dirigés contre le PS-O du lipopolysaccharide (LPS) bactérien (présent chez toutes les *Brucella* naturellement en phase S, *B. abortus* et *B. melitensis* notamment), rendant impossible la différenciation entre les animaux vaccinés et infectés avec les tests sérologiques de dépistage utilisés classiquement (épreuve à l'antigène tamponné ou Rose Bengale (RB), ELISA ou fixation du complément (FC) [Anses, 2015].

Bien que conditionnée par divers facteurs tels que la dose, la voie d'administration et l'état physiologique de l'animal, la réponse sérologique chez les animaux vaccinés à l'âge adulte est d'intensité plus élevée et durable que chez les animaux impubères, empêchant pratiquement toute opération d'assainissement fondée sur

l'élimination des sujets reconnus exposés et/ou infectés par sérologie. C'est la raison pour laquelle la prophylaxie sanitaire a été rapidement orientée vers la vaccination exclusive des jeunes femelles impubères (entre 3 et 6 mois). En France, et d'une façon plus générale dans toute l'Union Européenne, l'emploi d'un vaccin Rev.1 administré par instillation conjonctivale fut ainsi privilégié pour la vaccination des jeunes femelles ovines ou caprines. En effet, cette voie d'administration entraîne une réponse sérologique de plus faible intensité, limitée dans la majorité des cas à quelques mois et permettant la mise en place des contrôles sérologiques dès l'âge de 12-18 mois.

2.2 RISQUES D'AVORTEMENTS ET D'EXCRÉTION POST-VACCINALE

La souche Rev.1 possède un pouvoir pathogène résiduel qui varie selon l'espèce, l'âge et l'état physiologique des animaux lors de la vaccination, la voie d'administration et la dose vaccinale. Elle peut être une cause d'avortement chez la brebis et la chèvre, notamment lorsqu'elle est administrée par la voie sous-cutanée à mi-gestation [Zundel *et al.*, 1992 ; Blasco, 1997]. En pratique, ces effets délétères sont évités ou minimisés en privilégiant le mode d'administration par instillation conjonctivale et en ciblant la vaccination des jeunes avant la puberté (3-6 mois) [Anses, 2015].

Chez les adultes, la vaccination est plutôt recommandée chez les animaux non-gestants, en fin de gestation ou pendant la lactation, pour limiter les avortements et/ou l'excrétion génitale potentiellement induits par le vaccin [Zundel *et al.*, 1992]. Bien que l'innocuité ait été démontrée chez les brebis en lactation, plusieurs observations ont rapporté une excrétion post-vaccinale chez la chèvre, notamment dans le lait, y compris après une vaccination conjonctivale [Banaï, 1996, 2002 ; Higgins *et al.*, 2017 ; Xie *et al.*, 2018].

III - EXPÉRIMENTATION VISANT À COMPARER LE NIVEAU D'INNOCUITÉ DU VACCIN REV.1 CONJONCTIVAL CHEZ LE BOUQUETIN DES ALPES ET LA CHÈVRE DOMESTIQUE

1. OBJECTIFS

Les critères préalables à la vaccination des bouquetins *in natura* ont été examinés au cours d'un précédent travail d'expertise collective et de revue bibliographique [Anses et ONCFS, 2016]. Les

experts ont recommandé de confirmer l'innocuité du vaccin Rev.1 dans cette espèce sauvage, son utilisation étant jugée possible en cas d'innocuité comparable entre le bouquetin et un référentiel domestique (ovin ou caprin), correspondant à l'AMM du vaccin et pour lequel un grand recul

existe en matière de sécurité d'utilisation. En effet, la littérature nous apprend que les propriétés d'innocuité et d'efficacité d'un vaccin anti-brucellique (vaccin vivant atténué) peuvent difficilement se transposer d'une espèce à l'autre, en particulier d'une espèce domestique vers une espèce sauvage, comme cela a été largement documenté en regard des vaccins RB51 et S19 chez le bison ou le cerf dans la région du Yellowstone [National Academies of Sciences, 2017]. Pour des raisons réglementaires, techniques et éthiques précédemment développées lors de l'appui scientifique et technique de 2016 [Anses et ONCFS, 2016], il n'a pas été possible de réaliser un essai d'innocuité clinique chez des femelles gestantes, ni un essai d'efficacité vaccinale nécessitant la réalisation d'une épreuve virulente. En effet, de tels essais supposeraient de disposer d'un environnement à la fois hautement confiné et adapté au bien-être des bouquetins de même qu'aux risques importants d'avortement brucellique et d'excrétion associée.

L'objectif de la présente expérimentation était donc de comparer l'innocuité de la souche vaccinale Rev.1 entre le bouquetin des Alpes et la chèvre domestique (adultes et non gestants). Cette étude s'est focalisée sur la comparaison interspécifique de la distribution de la souche vaccinale sur 90 jours, des prélèvements et suivis ayant été prévus de façon séquentielle pour étudier la distribution de la souche vaccinale et sa capacité d'excrétion. Des suivis quotidiens par les animaliers, des mesures sérologiques, bactériologiques, zootechniques et hémato-cytologiques ont été réalisés afin de suivre :

1. la réponse immunitaire (sérologique & cellulaire) suite à la vaccination,
2. la distribution de la souche vaccinale dans l'organisme et la charge bactérienne des organes, et
3. le bien-être et l'état de santé des animaux en bâtiments.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Deux études expérimentales ont été conduites dans deux établissements disposant des agréments et de la capacité d'hébergement requis: la Réserve zoologique de la Haute Touche (RZHT, Obterre, France) pour les bouquetins, et la Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE) du centre INRA Val de Loire (Nouzilly, France) pour les chèvres domestiques. Toutes les expériences ont été

menées conformément aux directives de l'UE et à la réglementation française [Directive 2010/63/UE, 2010 ; Code rural, 2018 ; Décret n°2013-118, 2013]. Toutes les procédures expérimentales ont été évaluées et approuvées par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche (Notifications : APAFIS n°7643-2016112111336721 v4 et APAFIS n°7913-2016112911444302 v3). Les procédures relatives aux chèvres ont été évaluées par le comité d'éthique du Val de Loire (CEEA VdL, comité n°19 ; APAFIS n°7643), tandis que les procédures relatives aux bouquetins ont été évaluées par le comité d'éthique Cuvier (CEEA Cuvier, comité n°68 ; APAFIS n°7913).

2.1. SÉLECTION DES ANIMAUX

L'une des difficultés importantes de la présente étude a consisté à apparier les groupes de chèvres et bouquetins selon leur maturité sexuelle et leur état de santé. Ces facteurs impactent la sensibilité individuelle des animaux vis-à-vis de l'infection par *Brucella*. Or, l'âge de la maturité sexuelle du bouquetin est beaucoup plus tardif (2 à 5 ans) que celui de la chèvre (environ 4-6 mois pour les boucs et 6-18 mois pour les chèvres) [Ahmad et Noakes, 1996].

2.1.1 Bouquetins

Six mâles et six femelles non gestantes ont été recrutés dans trois parcs zoologiques (Parc des Angles, Domaine de Pescheray et RZHT). Pour l'expérimentation, les animaux ont été logés séparément à la RZHT en deux groupes, dans une installation de 170 m² spécialement adaptée à leur bien-être. L'âge des animaux était compris entre 2,5 et 5 ans. La maturité sexuelle de quatre bouquetins femelles a été confirmée en mesurant les taux plasmatiques de progestérone au cours de l'expérience (période correspondant à la saison de reproduction), tandis que deux femelles âgées de 2,5 ans n'ont présenté aucune élévation de progestérone plasmatique, indiquant l'absence d'activité cyclique [Santiago-Moreno *et al.*, 2003]. Les bouquetins mâles, tous âgés de plus de 3 ans, ont été considérés pubères [Couturier, 1962].

2.1.2 Chèvres domestiques

Douze chèvres adultes de race Alpine (six femelles non gravides et six mâles) ont été obtenues auprès de l'animalerie INRA du Magnériaud (France) et de la société CAPGENES (Agropole, Mignaloux-

Beauvoir, France). La maturité sexuelle a été confirmée chez les mâles et les femelles, à partir de la production de semence et des taux plasmatiques de progestérone respectivement. Tous les animaux ont été hébergés dans une bergerie de niveau 1 à l'INRA.

2.2 PROTOCOLE VACCINAL

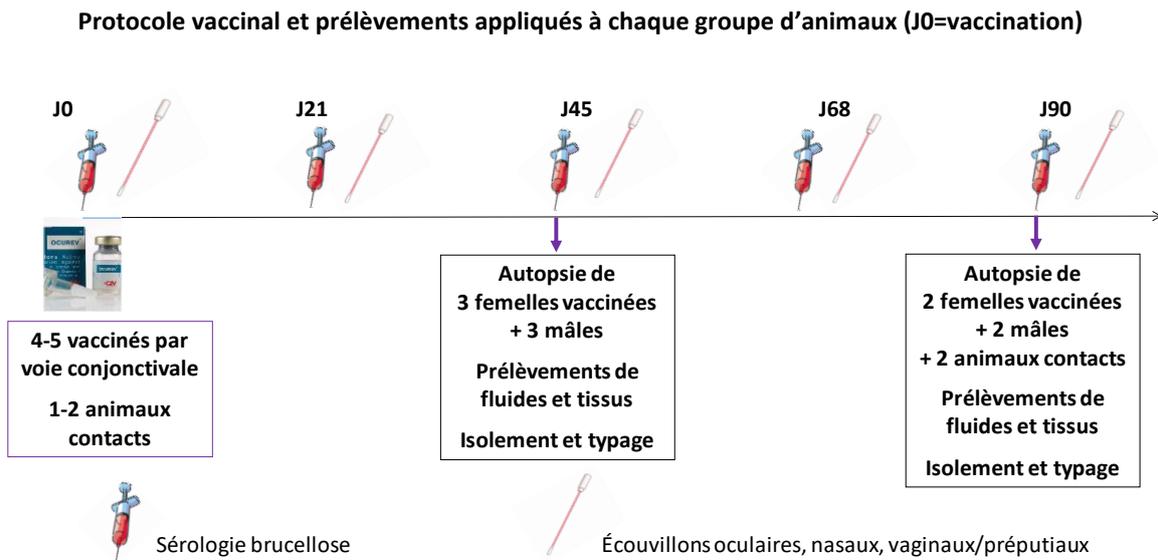
Le protocole vaccinal a consisté à instiller le vaccin Rev.1 (Ocurev®, CZ Veterinaria, Porriño, Espagne ; $1-2 \times 10^9$ UFC dans 35 µl/dose) par voie conjonctivale chez 10 chèvres (un groupe de cinq femelles et un groupe de cinq mâles) et 9 bouquetins (un groupe de quatre femelles et un groupe de cinq mâles ; la cinquième femelle n'a pas été vaccinée et a été gardée comme animal contact, des symptômes de diarrhée ayant été observés le jour de la vaccination). Les femelles incluses dans

l'expérimentation n'étaient ni gestantes, ni en lactation. La vaccination a été systématiquement pratiquée sur l'œil droit et selon les recommandations du fabricant.

Au sein de chaque lot, la moitié des animaux (2 individus vaccinés et 1 témoin) ont été euthanasiés à 45 jours post-vaccination (p-v) et l'autre moitié à 90 jours p-v, suite à l'induction de l'anesthésie. Tous les animaux ont ensuite été autopsiés.

Des suivis sérologiques, bactériologiques et hormonaux ont été effectués sur le sang prélevé 0, 21, 45, 68 et 90 jours après vaccination (p-v). Parallèlement, des écouvillons oculaires, nasaux et vaginaux ou préputiaux ont été recueillis pour examens bactériologiques. Des tests sérologiques ont été réalisés chez tous les animaux afin de vérifier la séroconversion des animaux vaccinés et l'exposition potentielle des animaux contacts non vaccinés (figure 1).

Figure 1



2.3 CONTRÔLE DU VACCIN UTILISÉ

Le lot 164164 du vaccin vivant atténué Ocurev® utilisé a été contrôlé par le Laboratoire national de référence (LNR) pour la brucellose de l'Anses, conformément aux recommandations de l'OIE [OIE, 2016]. Le contrôle d'un flacon supplémentaire utilisé le jour des vaccinations a été testé au laboratoire de l'UMR Infectiologie et santé publique (ISP) du centre INRA Val de Loire selon la même procédure.

2.4 SUIVI ZOOTECHNIQUE ET CLINIQUE

Le bien-être des animaux a été évalué deux fois par jour en notant cinq familles de paramètres : comportement, formulation sanguine, confort thermique, alimentation et état corporel. Le point final de la procédure expérimentale a été planifié en fonction du score, dans le cas où l'un des signes cliniques suivants aurait été observé : hyperthermie (>41°C), prostration, anorexie, diarrhée et/ou vomissements, perte de poids importante, nécrose des tissus, morsure.

2.5 PRÉLÈVEMENTS RÉALISÉS POUR LE DIAGNOSTIC DIRECT

2.5.1 Prélèvements réalisés du vivant de l'animal

Avant autopsie, les animaux ont été régulièrement manipulés pour la réalisation de prélèvement de sang, écouvillons nasal, oculaire et génital (vaginal ou préputial). Les écouvillons ont été apportés dans les heures suivant leur réalisation au laboratoire d'analyses vétérinaire de Touraine pour une mise en culture en frais. Le sang a été acheminé par transporteur pour la réalisation de sérologie et de mise en culture au laboratoire de référence.

2.5.2 Organes prélevés lors des autopsies

Les autopsies ont été effectuées à la PFIE dans une salle dédiée de confinement de niveau 3. Les tissus suivants ont été prélevés de manière aseptique avec des instruments stériles : rate, utérus (femelle) ou testicules (mâle), nœuds lymphatiques parotidiens, rétropharyngés, sous-maxillaires, pré-scapulaires, iliaques, rétro-mammaires (femelle) ou inguinaux superficiels (mâles). L'urine a été recueillie pendant l'autopsie par ponction vésicale. Les échantillons de tissus ont été préparés conformément aux recommandations de l'OIE [2016], pesés, puis transportés en frais au laboratoire de Touraine (Parçay-Meslay, France) pour une mise en culture dans les heures suivant l'euthanasie et la dissection. Les autres échantillons ont été conservés congelés à -80°C.

2.5.3 Préparation des échantillons

Les échantillons de tissu ont été coupés en petits morceaux puis broyés avec du PBS stérile (dilution au demi) avant d'être ensemencés sur un milieu solide. Chaque écouvillon a été réhydraté dans du PBS, avant d'être étalé sur deux boîtes de Petri, puis incubé à 37°C dans une atmosphère normale. Le sang total a été centrifugé (600 g, 15 min), puis le culot a été dilué dans un bouillon trypticase soja avec 5 % de sérum équin. Les bouillons ont été incubés à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Les échantillons de fumier (collectés au 68^e jour p-v) ont été hachés, dilués puis incubés pendant une nuit à 37°C, avant d'être soumis à une extraction d'ADN pour détection moléculaire et culture.

2.5.4 Culture bactériologique et méthodes moléculaires

La culture du sang et de tous les échantillons de tissus a été réalisée sur un milieu sélectif de Farrell modifié [OIE, 2016]. Chaque échantillon (0,2 ml) a été étalé sur 4 boîtes de Petri incubées à 37°C dans une atmosphère normale. Les cultures ont été conservées 10 jours pour détecter la présence de colonies. Les souches ont été isolées et identifiées à l'aide de caractéristiques de croissance et de méthodes bactériologiques [Alton *et al.*, 1988 ; OIE, 2016]. L'identification moléculaire a été réalisée par PCR en temps réel [Bounaadja *et al.*, 2009] et par la méthode Bruce-Ladder [Lopez-Goni *et al.*, 2008].

2.6 SUIVI SÉROLOGIQUE

Avant le début de l'expérimentation, tous les animaux ont été testés pour les maladies suivantes :

- CAEV (kit ELISA indirect de sérum ThermoFisher-Scientific, Lelystad BV, Pays-Bas),
- Fièvre Q par test ELISA (Kit ELISA indirect pour sérum, ThermoFisher-Scientific) et PCR (kit mini QI Amp DNA QIAGE, Courtaboeuf, France et ADIAVet Cox en temps réel (diagnostic BIOX, Rochefort, Belgique),
- Brucellose par test de fixation du complément (Pourquier® CFT Brucellose Ag, IDEXX, Montpellier, France) et test Rose Bengale (Pourquier® Rose Bengal Ag, IDEXX),
- Maladie des muqueuses par PCR (kit d'isolement universel LSI MagVet™ et kit d'amplification LSI VetMax™ PCR en temps réel) et ELISA (ruminant BVD p80 Ab sérum, ThermoFisher-Scientific),
- Fièvre catarrhale ovine par ELISA (Virus de la fièvre catarrhale, Kit de test d'anticorps VP7 ELISA, IDEXX) et
- Paratuberculose par ELISA indirect (ID Screen® Paratuberculosis, Id-Vet, France et IDEXX Paratuberculosis).

Les échantillons de sang ont été collectés, stockés et traités conformément aux procédures « standard » dans un laboratoire de niveau 3 de confinement. Le sang total a été centrifugé (500 g, 15 min). Les sérums ont été examinés pour rechercher la présence d'anticorps contre les espèces en phase

lisse de *Brucella* en utilisant les tests Rose Bengale et fixation du complément, conformément aux exigences de l'OIE [OIE, 2006]. Le score d'agglutination du test Rose Bengale (RB) a été noté sur une échelle de 0 (pas d'agglutination) à 4 (agglutination maximale), toute agglutination a été considérée comme positive. Le titre de FC (exprimé en UI FC/ml) a été interprété conformément à la norme U 47-004 [AFNOR, 2009].

2.7 TAUX PLASMATIQUES DE PROGESTÉRONE

Le sang hépariné des femelles a été centrifugé (500 g, 15 min) dans un laboratoire de niveau 3 de confinement et le plasma dosé par ELISA pour déterminer la concentration de progestérone selon les recommandations du fabricant (plasma OVUCHECK, Kitvia SAS, Labarthe-Inard, France). Les femelles ont été considérées cycliques et sexuellement matures lorsque les concentrations de progestérone étaient supérieures à 1,5 ng/ml [Santiago-Moreno *et al.*, 2003].

2.8 ANALYSES STATISTIQUES

Les corrélations de rang de Spearman et le test de Mann & Whitney ont été calculés avec GraphPad Prism® 7.03 (logiciel GraphPad) pour les analyses hématologiques. L'analyse exploratoire multivariée en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT pour les analyses bactériologiques (XLSTAT-Base®, Addinsoft) (corrélation de Spearman, biplot de distance).

Les résultats sérologiques ont été analysés selon les critères suivants :

- Score d'agglutination du test RB ;
- Titre de FC ;
- Statut sérologique individuel associant les résultats RB et FC : séropositif (résultats positifs avec RB et FC) ou séronégatif (résultats négatifs avec RB ou FC).

Un modèle mixte a été utilisé, chaque individu étant considéré comme effet aléatoire [Dohoo *et al.*, 2009]. Les effets fixes pris en compte ont été l'espèce (bouquetin, chèvre), le jour du prélèvement (20, 45, 68, 90 jours p-v) et la présence d'une bactériémie au 20^e jour p-v (oui/non). La significativité de chaque coefficient a été testée à

l'aide de tests de Wald [Burnham et Anderson, 2002].

Les résultats des examens bactériologiques des animaux vaccinés ont été analysés selon différents «critères d'innocuité» :

- Gradient de dissémination de la souche Rev.1 chez les individus vaccinés, en prenant en compte la proportion d'organes positifs pour la culture ;
- Proportion d'organes positifs pour la culture de la région pelvienne, comprenant les écouvillonnages génitaux, l'urine, les ganglions lymphatiques rétro-mammaires, les ganglions inguinaux et les ganglions lymphatiques iliaques internes ;
- Charge bactérienne parmi les organes infectés, c'est-à-dire le nombre maximal de colonies observé par boîte ;
- Risque de transmission aux individus témoins, en considérant le statut bactériologique final des individus en contact dans chaque groupe (pas de modélisation).

Pour ces analyses portant sur les résultats bactériologiques, des modèles logistique (pour la proportion d'organes infectés) ou gaussien mixtes (pour la charge bactérienne des organes positifs en culture) ont été utilisés. Le terme « mixte » désignant le fait que l'identité de chaque individu a bien été prise en compte, dans la mesure où chaque animal a été prélevé plusieurs fois et sur un nombre de 3 à 11 organes [Zuur *et al.*, 2009]. Les effets fixes (non lié à l'individu) pris en compte étaient l'espèce (bouquetin, chèvre), le sexe (mâle, femelle), la date de prélèvement (20, 45, 68, 90 jours pv) et le type de prélèvement (prélèvement *in vivo*, autopsie). La sélection du modèle a été effectuée selon le critère d'Akaike (AIC) : lorsqu'une différence inférieure à 2 pour le critère AIC a été observée entre 2 modèles, le principe de parcimonie a été appliqué [Burnham et Anderson, 2002]. En partant d'un modèle complet, une procédure descendante pas à pas a été appliquée pour retirer les facteurs non significatifs. La significativité de chaque coefficient a ensuite été testée à l'aide de tests de Wald [Burnham et Anderson, 2002]. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.4.2 [the R foundation for statistical computing, 2017] et les modules lme4 [Bates et Sarkar, 2007] et MuMIn [Barton, 2009].

3. RÉSULTATS

3.1 CONTRÔLE DU VACCIN

Le lot du vaccin utilisé était conforme aux recommandations de l'OIE. La concentration a été estimée à $1,6 \times 10^9$ CFU/dose à partir de dénombrements, correspondant à celle revendiquée par le fabricant (1 à 2×10^9 CFU/dose).

3.2 SUIVI ZOOTECHNIQUE ET CLINIQUE

3.2.1 Bouquetins

Aucun signe clinique n'a été observé pendant la phase d'acclimatation des animaux en bâtiment. En amont de la vaccination, le suivi vétérinaire a diagnostiqué des parasites chez plusieurs bouquetins. Tous les animaux ont donc été traités avec un anthelminthique avant la vaccination (Fenbendazole/Panacur®, MSD Animal Health, Merck & CO., Inc., Kenilworth, USA). Au cours de l'expérience, le suivi clinique des animaux a révélé une diarrhée épisodique et un complément alimentaire gastro-intestinal de type Phoscargil® (San'Elevage, Changé, France) a été administré à tous les animaux. Aucune hyperthermie, polypnée, tachycardie, prostration, anorexie, perte de poids ou plaintes n'ont été observées. Aucun animal n'est tombé malade ou n'est mort en lien avec la vaccination. Cependant, au cours de l'expérimentation, deux chèvres sont décédées sans signe clinique (7 et 20 jours p-v respectivement) et une troisième a développé une mammite au 45^e jour p-v. Lors de l'autopsie, aucune lésion évoquant une infection brucellique telle que décrite par Freycon *et al.* [2017] et Lambert *et al.* [2018] n'a été observée chez les animaux. Les formules sanguines (formulation sanguine générale (globules blancs, globules rouges et plaquettes) ont montré des animaux en bonne santé et une domestication des animaux en fonction du temps suite à la diminution de l'hématocrite.

3.2.2 Chèvres

Aucun signe clinique n'a été observé pendant la phase d'acclimatation, ni après la vaccination des chèvres, à l'exception du mâle 62107 qui a présenté des écoulements nasaux au 5^e jour p-v. Néanmoins, deux morts sont survenues dans le lot des cinq chèvres vaccinées, probablement en rapport avec d'autres maladies sous-jacentes et un mauvais état

général. Ces deux chèvres vaccinées (individus 10139 et 30313) ont été retrouvées mortes au jour 6 et au jour 13, respectivement, sans aucun signe clinique détecté. Ces mortalités pourraient avoir été causées par une paratuberculose chronique (taux élevé d'anticorps détecté avant l'expérimentation) au vu du tableau lésionnel observé (misère physiologique associée à une probable malabsorption intestinale). Une troisième chèvre vaccinée (20055) a révélé une mammite au 42^e jour p-v et a été euthanasiée pour des raisons de bien-être animal. Toutefois, aucune lésion macroscopique évoquant une brucellose n'a été observée à l'autopsie chez ces deux animaux. Les formules sanguines, sur les chèvres restantes de l'étude, ont montré également des animaux en bonne santé.

3.3 RÉPONSE SÉROLOGIQUE

L'évolution de la réponse sérologique après la vaccination dans les tests RB et FC est illustrée dans les figures 2 et 3. Tous les animaux ont présenté une séroconversion dans les 45 jours suivant la vaccination. Cependant, la réponse sérologique (score RB et titre FC) était significativement plus intense et plus persistante chez les bouquetins que chez la chèvre. Tous les bouquetins sont restés séropositifs jusqu'à leur euthanasie (J45 ou J90), avec des résultats positifs pour RB et FC), tandis qu'une seule chèvre est restée séropositive pour les 2 tests au 90^e jour p-v (tableau 1).

On a par ailleurs pu constater la transmission de la souche vaccinale au mâle contact, lequel a séroconverti entre J45 et J68, transmission à mettre très probablement en rapport avec l'excrétion urogénitale chez deux mâles du même groupe. Cet animal a présenté une séroconversion et une infection reproduisant entre J68 et J90 le même type de réponse que celle développée entre J20 et J45 par les bouquetins initialement vaccinés.

3.4 DISTRIBUTION DE LA SOUCHE VACCINALE CHEZ LES BOUQUETINS ET LES CHÈVRES

Au total, 375 échantillons ont été analysés chez 22 animaux, suivis plus de 20 jours après la vaccination (soit 10 chèvres et 12 bouquetins, 17 vaccinés et 5 non vaccinés). Au total, 94 ont donné un résultat positif en culture (tableau 2).

Figure 2

Scores d'agglutination par le test Rose Bengale pendant 90 jours p-v
chez les bouquetins (A) et les chèvres (B) vaccinés avec la souche Rev.1

Légende : mâles (triangles), femelles (cercles)

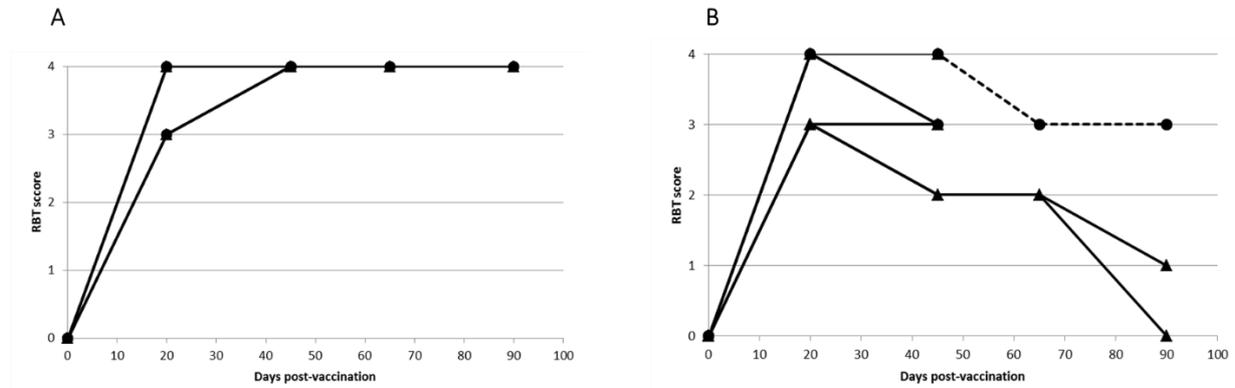


Figure 3

Evolution des titres du test de fixation du complément, mesurés pendant 90 jours p-v
chez les bouquetins (A) et les chèvres (B) vaccinés avec la souche Rev.1

Légende : mâles (triangles), femelles (cercles)

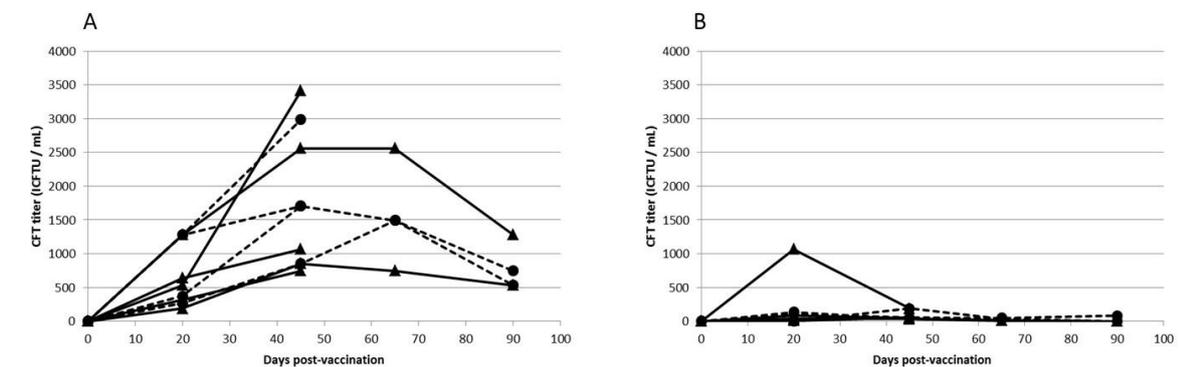


Tableau 1

Évolution du statut sérologique des bouquetins et des chèvres 90 jours après vaccination

Proportion d'animaux séropositifs (résultats RB et FC positifs)	Jours post-vaccination				
	0	21	45	68	90
<i>Capra ibex</i>	0	9/9	9/9	4/4	4/4
<i>Capra hircus</i>	0	6/8	8/8	2/4	1/4

*RB : Rose-Bengale et FC : Fixation du complément

Tableau 2

Nombre d'organes et prélèvements présentant un résultat positif (POS) ou négatif (NEG)
par culture bactérienne pour chaque animal (numéro d'identification et espèce indiquée)
de 20 à 90 jours après la vaccination (p-v).

Les résultats positifs sont en **gras** et les autopsies *en italique*

Chèvres		J20 (<i>In vivo</i>)		J45 (<i>In vivo</i> ou Autopsie)		J68 (<i>In vivo</i>)		J90 (Autopsie)		Total
contacts		NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	
20072	F	3	0	3	0	3	0	11	0	20
13101	M	3	0	3	0	3	0	11	0	20
vaccinées		NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	Total
40176	F	3	0	3	0	3	0	9	2	20
50105	F	3	0	3	0	3	0	10	1	20
20055*	F	3	0	6	5					14
61003	M	3	0	8	3					14
6145	M	3	0	6	5					14
16142	M	3	0	7	4					14
61275	M	3	0	3	0	3	0	10	1	20
62107	M	2	1	3	0	3	0	9	2	20
IBEX		J20 (<i>In vivo</i>)		J45 (<i>In vivo</i> ou Autopsie)		J68 (<i>In vivo</i>)		J90 (Autopsie)		Total
contacts		NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	
1926	F	3	0	3	0	3	0	11	0	20
2349	F	3	0	9	0					12
1895	M	3	0	3	0	3	0	5	6	20
vaccinés		NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	Total
7462	F	3	0	3	0	3	0	5	6	20
2393	F	3	0	3	0	3	0	6	4	19
1920	F	3	0	4	6					13
1933	F	2	1	4	6					13
1828	M	3	0	5	6					14
1839	M	1	2	4	7					14
1890	M	2	1	4	7					14
2000	M	1	2	3	0	2	1	5	6	20
3094	M	1	2	2	1	3	0	5	6	20
total		57	9	92	50	35	1	97	34	375

* Chèvre morte pendant l'expérimentation

Tous les animaux vaccinés ont présenté au moins un résultat positif en culture ; tous étaient positifs à l'autopsie dans la région de la tête (multiplication initiale locale). De plus, le bouquetin mâle contact non vacciné a été trouvé infecté par la souche Rev.1 (6 organes sur 11 examinés ayant donné un résultat positif en culture), tandis que les quatre autres contacts (une chèvre et un bouc, deux bouquetins femelles) ont présenté un résultat négatif en culture au moment de l'autopsie. Ce résultat confirme la transmission de la souche vaccinale d'animaux vaccinés à animal témoin, suggéré par la séroconversion de ce dernier à mi-expérimentation. Enfin, il a été observé que la diffusion systémique de la bactérie, estimée par hémoculture ou culture directe sur leucocytes, est également contrastée entre les deux espèces. Détectée chez l'ensemble des bouquetins (mâles et femelles) 20 jours p-v, une bactériémie n'a été détectée que chez deux boucs à ce même stade, un troisième bouc ayant présenté une bactériémie positive à J7 uniquement. Aucune bactériémie n'a été détectée au-delà de 20 jours p-v dans les deux espèces.

La proportion d'organes positifs en culture a été étudiée sur les prélèvements issus des 17 animaux vaccinés suivis pendant 45 ou 90 jours p-v (n=50). Des effets significatifs du temps écoulé p-v, du mode d'échantillonnage (autopsie vs animaux vivants) et de l'espèce ont été observés, mais pas d'effet significatif du sexe des animaux. La probabilité d'observer des résultats positifs a été beaucoup plus faible lors d'un prélèvement *in vivo* que lors de l'autopsie (OR *in vivo*/autopsie=0,037, 95 % IC [0,005 ; 0,289]). Cette probabilité était également plus faible à 90 jours par rapport à 45 jours p-v (OR 90 contre 45=0,091, 95 % IC [0,010 ; 0,860]). La proportion d'organes positifs en culture a été plus élevée chez les bouquetins que chez les chèvres (bouquetin OR/caprin=4,184, 95 % IC [2,311 ; 7,574]). En focalisant l'analyse sur les organes de la région pelvienne, des effets significatifs de l'espèce (OR bouquetin/chèvre=7,222, 95 % IC [2,192 ; 23,799]) et du mode de prélèvement (OR *in vivo*/autopsie=0,154, 95 % IC [0,032 ; 0,733]) ont également été observés.

Dans les organes infectés des bouquetins, les charges moyennes de la souche Rev.1 ont varié de 1 à 300 au 45^e jour p-v, puis de 1 à 100 au 90^e jour p-v. Chez les chèvres, la charge moyenne de la

souche Rev.1 a varié de 1 à 30 au 45^e jour p-v, puis de 1 à 10 au 90^e jour p-v. Des effets significatifs du temps écoulé p-v, du type d'organe et de l'espèce ont été observés, mais le sexe des animaux n'a pas influencé les résultats de manière significative. La charge bactérienne était significativement plus faible dans les écouvillons oculaires ou nasaux que dans tout autre organe, y compris les prélèvements génitaux et d'urine (P Ex_head/Ex_genital=-4,876, 95 % IC [-8,229 ; -1,523]). La charge bactérienne a beaucoup diminué entre 45 et 90 jours p-v (P 90 vs 45=-2,167, 95 % IC [-3,145 ; -1,188] sur une échelle logarithmique). La charge bactérienne des organes positifs en culture était également beaucoup plus élevée chez les bouquetins que chez les caprins (P ibex/caprin=+ 2,4101, 95 % IC [+ 1,409 ; 3,411] sur une échelle logarithmique). De plus, l'effet de l'espèce a sans doute été sous-estimé dans notre analyse dans la mesure où la plupart des organes positifs chez les bouquetins présentaient une charge bactérienne non estimable supérieure à 300 colonies¹¹ par boîte 45j p-v.

Logarithmique

3.5 ANALYSE DES PRÉLÈVEMENTS ENVIRONNEMENTAUX

Aucun des échantillons de fumier collectés au 68^e jour p-v n'a révélé la présence de *Brucella* (ni détection de l'ADN ni isolement des bactéries). L'efficacité et la sensibilité de ces deux méthodes ont été évaluées à 10⁴ UFC/g, en utilisant des dilutions sériées d'une souche de référence de *B. melitensis* ajoutée à un panel d'échantillons de fumier négatif (données non présentées).

4. DISCUSSION

Comme prévu lors de la vaccination par Rev.1, tous les animaux vaccinés ont séroconverti et ont présenté une multiplication locorégionale de la souche Rev.1. Aucun de ces animaux vaccinés n'a développé de lésion détectable ou de signe clinique attribuable au vaccin Rev.1 [Fensterbank *et al.*, 1987 ; Zundel *et al.*, 1992 ; Blasco, 1997], même si trois chèvres vaccinées ont été retrouvées mortes ou bien euthanasiées du fait de signes pathologiques. Cependant, contrairement aux attentes des experts, ces résultats ont révélé un résultat vaccinal très contrasté entre les deux espèces, ce qui a invalidé l'hypothèse nulle d'innocuité comparable du vaccin Rev.1 entre le bouquetin des Alpes et la chèvre domestique.

¹¹ Pour mémoire la capture d'animaux avant 8 mois est presque impossible, les bouquetins femelles arrivent à maturité sexuelle entre deux et quatre ans selon les populations et les individus.

4.1 DISTRIBUTION DE LA SOUCHE VACCINALE REV.1

La proportion d'échantillons infectés par Rev.1 et la charge bactérienne observée dans les organes positifs ont été significativement plus élevées chez les bouquetins que chez les chèvres. Dans cette expérimentation, les différences entre ces deux espèces ont été le facteur prédominant, tandis que les effets des facteurs individuels comme le sexe ont été négligeables. La proportion d'organes infectés, au niveau individuel ou ciblant les organes pelviens, a diminué avec le temps [comme attendu par extrapolation du modèle ovin, Muñoz *et al.*, 2008], sans pour autant sur la souche vaccinale disparaître 90 jours p-v dans aucune des deux espèces ; les animaux autopsiés à j90 p-v présentant des charges bactériennes modérées à faible avec une variabilité individuelle importante. Ces résultats suggèrent un risque plus élevé d'excrétion de Rev.1 entre le jour 20 et le jour 68 chez les bouquetins en comparaison des chèvres. Etant donné la persistance de la bactérie observée 90 jours p-v, personne ne peut exclure une persistance potentielle ou une disparition à long terme chez les bouquetins (ou chèvres) vaccinés. De rares données sont publiées sur la vaccination des chèvres adultes non gestantes. Cependant, des réponses sérologiques prolongées [Stournara *et al.*, 2007] ainsi que l'excrétion post-vaccinale dans le lait [Higgins *et al.*, 2017] ont été rapportées, étayant l'hypothèse d'une possible infection systémique dans cette espèce. Deux bouquetins mâles vaccinés ont présenté une excrétion urogénitale 20, 45 ou 68 jours p-v, qui n'a pas été observée dans les autres lots d'animaux vaccinés. Conséquence logique, le bouquetin mâle témoin partageant le même box a séroconverti entre 45 et 68 jours p-v.

Etant donné qu'aucune bactérie vivante n'a été détectée dans les prélèvements environnementaux et que le vaccin Rev.1 est moins résistant aux rayons ultraviolets que les souches sauvages [Al-Mariri, 2008], il est probable que l'infection du bouquetin mâle ait été favorisée par la promiscuité avec les autres mâles vaccinés partageant le même box. Néanmoins, la distribution de Rev.1 suggère une capacité inférieure de l'espèce bouquetin à contenir la multiplication de la souche vaccinale et un risque plus élevé d'excrétion de Rev.1, voire de transmission ultérieure, par rapport à la chèvre domestique. Compte tenu de ces contrastes, il est également très difficile d'évaluer l'efficacité du vaccin chez le bouquetin à partir d'observations réalisées sur des espèces domestiques. Nous pouvons même émettre l'hypothèse d'une susceptibilité plus grande du bouquetin des Alpes aux effets secondaires du vaccin tels que les

avortements si le vaccin était employé sur des femelles gestantes. Une différence d'impact vaccinal chez les espèces sauvages et domestiques avait déjà été observée, en particulier chez le bison d'Amérique (*Bison bison*) et le wapiti (*Cervus canadensis*) en ce qui concerne *B. abortus* [National Academies of Sciences, 2017]. Il a été constaté que ces espèces indigènes nord-américaines étaient plus susceptibles de subir un avortement causé par le vaccin vivant atténué que la vache domestique (*Bos taurus*) [Olsen *et al.*, 1997 ; Kreeger *et al.*, 2002 ; Olsen *et al.*, 2006 ; Olsen et Johnson, 2011]. Dans le cas du bouquetin des Alpes, l'hypothèse d'une coévolution limitée avec des agents pathogènes du bétail, dont *Brucella* peut être formulée, notamment en raison de sa répartition historique [Gauthier *et al.*, 1991]. En outre, les bouquetins des Alpes chassés intensivement ont presque complètement disparu au XIX^{ème} siècle et leur restauration récente était fondée sur de petits nombres d'animaux [Gauthier et Villaret, 1990]. Un tel contexte historique peut avoir entraîné des goulots d'étranglement génétiques et une diminution consécutive de la capacité immunitaire à se défendre vis-à-vis d'agents infectieux comme *Brucella* [Maudet *et al.*, 2002].

4.2 RÉPONSE IMMUNITAIRE

Les *Brucella* sont des bactéries intracellulaires qui provoquent une réponse immunitaire à la fois humorale et à médiation cellulaire. L'antigène majeur de *Brucella* est le LPS-S qui induit une réponse immunitaire T-dépendante avec prépondérance de l'immunoglobuline de type IgG1 [Ducrotoy *et al.*, 2016]. Dans la présente étude, les chèvres ont séroconverti le mois suivant la vaccination avec la souche Rev.1, puis la réponse humorale a diminué jusqu'à 90 jours. Ce schéma sérologique correspond à ceux décrits précédemment, puisque 100 % des chèvres vaccinées étaient positives aux tests sérologiques à 45 jours p-v avec une diminution progressive de la séropositivité de 50 % et 25 % à 68 et 90 jours p-v respectivement. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Muñoz *et al.* [2008] chez des béliers adultes vaccinés par voie conjonctivale, qui ont présenté une diminution progressive des réponses sérologiques de 6 semaines à 90 jours. Comme rapporté par ces mêmes auteurs, des divergences ont été observées entre les tests, deux chèvres présentant des résultats positifs et négatifs pour les tests RB et FC, respectivement à 90 jours p-v. Cela peut s'expliquer par la différence de sensibilité du

test RB aux différentes immunoglobulines (IgM et IgG) par rapport au test FC [Allan *et al.*, 1976].

Un résultat important de cette expérience concerne l'intensité de la réaction immunitaire très contrastée entre les deux espèces. La réponse humorale a été plus intense et prolongée chez les bouquetins que chez les chèvres, avec des résultats positifs persistants chez tous les bouquetins jusqu'à la fin de l'expérience. Cette réponse est généralement plus élevée et persistante chez les adultes que chez les animaux immatures [Blasco, 1997 ; Ducrotoy *et al.*, 2018], et davantage encore chez les animaux gravides lors de la vaccination. Le développement de la réponse immunitaire à l'infection à *Brucella* n'est pas documenté chez les bouquetins, même si les titres de FC observés chez les bouquetins naturellement infectés du massif du Bargy suggèrent une réponse sérologique plus forte et plus durable par rapport à l'espèce domestique infectée par la même espèce de *Brucella* [Lambert *et al.*, 2018]. La présente expérience représente à notre connaissance la première étude longitudinale de la séroconversion dans cette espèce.

Des réponses humorales très élevées ont déjà été rapportées chez des wapitis vaccinés avec RB51, présentant en parallèle une bactériémie prolongée et des réponses cellulaires plus faibles par rapport aux réponses observées chez les bovins ou les bisons [Olsen *et al.*, 2002]. La protection contre *Brucella*, en tant qu'agent pathogène intracellulaire, est principalement associée à la réponse cellulaire de type Th1 et à l'activation des cellules T cytotoxiques, des cellules Killer et des macrophages [Dorneles *et al.*, 2017]. En comparaison, les cytokines associées à une réponse de type Th2 peuvent stimuler la réponse humorale mais également avoir des effets régulateurs négatifs sur les réponses de type Th1 [Morel et Oriss, 1998]. Chez les wapitis, malgré des taux d'anticorps très élevés, l'absence de réponse immunitaire cellulaire et les réductions associées de la protection vaccinale pourraient être expliquées par un déséquilibre Th1-Th2 [Olsen *et al.*, 2002 et 2006]. Nos résultats conduisent à des hypothèses similaires chez les bouquetins et pourraient correspondre à une réponse immunitaire « naïve » chez les espèces sauvages n'ayant pas évolué conjointement avec *Brucella*, et/ou à une capacité immunitaire intrinsèque plus faible vis-à-vis de ce pathogène. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la réponse

immunitaire de *Brucella* chez les ruminants sauvages et son implication dans le développement de la maladie et les profils d'excrétion. Il serait également utile d'évaluer plus finement l'impact potentiel du facteur « stress » lié à la captivité dans l'espèce bouquetin, même si les bouquetins utilisés dans cette expérimentation étaient nés en captivité.

4.3 IMPACTS SUR LES STRATÉGIES DE CONTRÔLE

Pour l'utilisation du vaccin sur le terrain, il convient de rappeler que, sur un plan opérationnel, la capture des bouquetins conditionne leur vaccination conjonctivale *in natura*. Or la mise en œuvre de captures pour cette espèce est principalement possible entre fin avril et début juin, soit au cours du 2^{ème} tiers de gestation des femelles bouquetins. Si l'on se base sur le modèle ovin, vacciner en fin de gestation représente un risque modéré d'avortement post-vaccinal [Zundel *et al.*, 1992 ; Jiménez De Bagués *et al.*, 1989]. Néanmoins, les charges bactériennes étant élevées chez les bouquetins vaccinés dans notre expérience, il semble difficile d'écarter un risque d'avortement dans cette espèce, même en fin de gestation. Dans la mesure où le diagnostic de gestation des femelles bouquetins sur le terrain est compliqué à mettre en œuvre au chevet des animaux capturés (échographie), la vaccination de femelles gestantes est difficile à éviter ; ainsi, la survenue d'avortements et/ou la contamination des jeunes *via* le lait maternel seraient inévitables lors d'un déploiement vaccinal. Nous ne pouvons donc pas écarter le risque d'une diffusion intra-spécifique de la souche vaccinale lors d'un déploiement en nature dans cette espèce (voire une diffusion inter-spécifique, chez les ruminants domestiques). Or, l'un des principaux problèmes de l'utilisation de la vaccination chez les ruminants est l'impossibilité de faire la différence par sérologie entre des animaux positifs du fait de la vaccination et ceux infectés par la souche sauvage [Blasco, 1997 ; Ducrotoy *et al.*, 2018]. Si des cas de transmission de la souche vaccinale étaient avérés du fait d'avortements post-vaccinaux, des bouquetins non vaccinés et non infectés pourraient se séroconvertir et être considérés à tort comme infectés, venant compliquer la gestion (test et euthanasie des séropositifs) et la surveillance du foyer sauvage (fondée sur l'évolution de la séroprévalence).

IV - CONCLUSION

Pour conclure, au vu de ces résultats, il apparaît que la distribution de la souche Rev.1, le risque d'excrétion et la réponse immunitaire humorale associés à la vaccination, testés selon un même plan expérimental entre le Bouquetin des Alpes (en captivité) et la Chèvre domestique, ne sont pas équivalents entre ces deux espèces. Le Bouquetin exprime une réponse immunitaire humorale plus intense et prolongée que la Chèvre domestique. La distribution et la charge par organe de la souche vaccinale sont également beaucoup plus importantes chez le Bouquetin des Alpes, en particulier dans la sphère urogénitale. L'excrétion observée chez deux mâles bouquetins sur cinq a été associée à la séroconversion du mâle contact non vacciné et donc, très probablement, à la transmission de la souche vaccinale par l'un des deux mâles précédents. Sur la base de ces résultats, il apparaît que le Bouquetin des Alpes est très probablement plus sensible à la souche vaccinale Rev.1 que la Chèvre domestique, et présente, de ce

fait, un risque accru d'excrétion et de diffusion intraspécifique, voire interspécifique, de la souche vaccinale. Les contraintes associées à l'utilisation du vaccin *in natura* (captures physiques des bouquetins au printemps) sont par ailleurs de nature à favoriser la diffusion de cette souche et la séroconversion « à tort » d'animaux non infectés. Concernant le risque environnemental que représenterait une vaccination *in natura* pour l'Homme et les espèces domestiques, l'excrétion de la souche vaccinale observée dans les urines de bouquetins ne pose *a priori* pas plus de risque que pour la souche sauvage déjà présente sur le site du Bargy, et vis-à-vis de laquelle ce mode de transmission a été jugé négligeable par un précédent groupe d'experts. Ces conclusions ne sont pas définitives quant à l'utilisation du vaccin en nature, dont l'intérêt est examiné dans le cadre plus large d'évaluation des stratégies de gestion (avis Anses et thèse en cours).

BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR. - Norme U 47-004 - Recherche d'anticorps contre la brucellose par la microméthode de fixation du complément, AFNOR, avril 2009.
- Ahmad N., Noakes D.E. - Sexual maturity in British breeds of goat kids. *Br. Vet. J.*, 1996, **152**, 93-103.
- Allan G.S., Chappel R.J., Williamson P., McNaught D.J. - A quantitative comparison of the sensitivity of serological test for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg. (Lond)*, 1976, **76**, 287-298.
- Al-Mariri A. - Ultraviolet C lethal effect on *Brucella melitensis*. *New Microbiol.*, 2008, **31**, 47-55.
- Alton G.G. - Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats-a review. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 1987, **19**, 65-74.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. - Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.
- Anses - Mesures de maîtrise de la brucellose chez les bouquetins du Bargy, 2015, 194 pages.
- <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2014sa0218Ra.pdf>.
- Anses et ONCFS - Rapport d'appui scientifique et technique pour définir et évaluer bibliographiquement les critères préalables à une approche vaccinale contre la brucellose chez les bouquetins du massif du Bargy, 2016, 29 pages.
- <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2016SA0146Ra.pdf>.
- Banai M. - Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet. Microbiol.*, 2002, **90**, 497-519. Review.
- Banai M., Abramson M., Mayer I., Chechik K., Hoida G., Zamir O., Bardenstein S., Cohen A., Davidson M. - Problems associated with the persistence and possible horizontal transfer of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine in connection with serological surveillance in Israel, 1996, p. 69-76. In B. Garin-Bastuji, A. Benkirane (ed.), FAO/WHO/OIE Round Table on the Use of Rev.1 Vaccine in Small Ruminants and Cattle. Centre

- National d'Études Vétérinaires et Alimentaires, Maisons-Alfort, France.
- Barton K. - Mu-MIn: Multi-model inference. R Package Version 0.12.2/r18, 2009.
<http://R-Forge.R-project.org/projects/mumin/>
- Bates D., Sarkar D. - lme4: Linear Mixed-Effects Models Using Eigen and S4. R package version 0.9975-12, 2007, URL
<http://CRAN.R-project.org/>.
- Blasco J.M., Molina Flores B. - Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2011, **27**, 95-104. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.003.
- Blasco J.M. - A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, 1997, **31**, 275-283.
- Bosseray N. - *Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*, 1991, **19**, 355-363.
- Bounaadja L., Albert D., Chenais B., Henault S., Zygmunt M.S., Poliak S. - Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcs31 and per target 137 genes. *Vet. Microbiol.*, 2009, **137**, 156-164.
- Burnham K.P., Anderson D.R. - Model selection and multimodel inference - A practical information-theoretic approach - Second edition. Springer Verlag, New York, 2002, 488 pages.
- Code Rural et de la Pêche Maritime (version consolidée au 30 septembre 2018), 2018.
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?cidTexte=LEGITEXT000006071367>
- Couturier M.A.J. - Le Bouquetin des Alpes (*Capra aegragrus ibex ibex*). Grenoble: Arthaud, 1962, 1564 pages.
- Décret n°2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, 2013.
<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2013/2/1/AGR1231951D/jo/texte>
- Directive 2010/63/EU. - Directive of the European Parliament and of The Council Of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, 2010.
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>
- Dohoo I., Martin W., Stryhn H. - Mixed models for discrete data. In I. Dohoo, W. Martin, H. Stryhn (ed.), *Veterinary Epidemiologic Research*, 2nd Edition, VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, 2009, 579-603.
- Dorneles E.M.S., Oliveria L.F., Lage A.P. - *Brucella abortus* vaccines: use in control programs and immune response. *J. Bact. Mycol.*, 2017, **4**(1), 1044, 6 pages.
- Ducrotoy M.J., Muñoz P.M., Conde-Álvarez R., Blasco J.M., Moriyón I. - A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, 2018, **151**, 57-72.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) - The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 2014, **12**(2), 3547, 312 pages. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547.
- Elberg S.S., Faunce K. - Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *J. Bact.*, 1957, **73**, 211-217.
- Elberg S.S., Meyer K.F. - Caprine immunization against brucellosis. *Bull. Wld Hlth Org.*, 1958, **19**, 711-724.
- Elberg S.S. - A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. World Health Organization publication VPH/81.31. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland, 1981.
- Elberg S.S. - Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. Part III 1981-1995. *Vet. Bull.*, 1996, **66**, 1193-1200.
- Fensterbank R., Verger J.M., Grayon M. - Conjunctival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain Rev 1. *Ann. Rech. Vét.*, 1987, **18**, 397-403.
- Fensterbank R., Pardon P., Marly J. - Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Ann. Rech. Vét.*, 1985, **16**, 351-358.
- Freycon P., Game Y., Hars J., Gilot E. - Lesional aspects of *Brucella melitensis* in *Capra ibex*. *Bull. Acad. Vét. France*, 2017, **170**, 126-130.
- Garin-Bastuji B., Hars J., Drapeau A., Cherfa M.A., Game Y., Le Horgne J.M., Rautureau S., Maucci E., Pasquier J.J., Jaÿ M., Mick V. - Re-emergence of *Brucella melitensis* in wildlife, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, **20**, 1569-1570.

- Gauthier D., Villaret J.C. - La réintroduction en France du bouquetin des Alpes. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 1990, **45**(Suppl. 5), 97-120.
- Gauthier D., Martinot, J.P., Choisy J.P., Michallet J., Villaret J.C., Faure E. - Le bouquetin des Alpes. *Rev. Ecol.*, 1991, **46**(Suppl. 6), 233-275.
- Godfroid J., Garin-Bastuji B., Saegerman C., Blasco J.M. - Brucellosis in terrestrial wildlife. *OIE Sci. Tech. Rev.*, 2013, **32**, 27-42.
- Hars J., Vaniscotte A., Game Y., Toigo C., Depecker A., Garin-Bastuji B. - Surveillance et gestion d'un foyer de brucellose chez le bouquetin dans le massif du Bargy (Haute-Savoie). *Revue ONCFS Faune Sauvage*, 2015, **306**, 11-20.
- Higgins J.L., Gonzalez-Juarrero M., Bowen R.A. - Evaluation of shedding, tissue burdens, and humoral immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence vaccine strain Rev. 1. *PLoS ONE*, 2017, **12**(10), e0185823.
- Kreeger T.J., Cook W.E., Edwards W.H., Elzer P.H., Olsen S.C. - *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in elk. II. Failure of high dosage to prevent abortion. *J. Wildl. Dis.*, 2002, **38**(1), 27-31.
- Lambert S., Gilot-Fromont E., Freycon P., Thébault A., Game Y., Toigo C., Petit E., Barthe M.N., Reynaud G., Jaÿ M., Garin-Bastuji B., Ponsart C., Hars J., Rossi S. - High shedding potential and significant individual heterogeneity in naturally-infected alpine ibex (*Capra ibex*) with *Brucella melitensis*. *Front. Microbiol.*, 2018, **9**, 1065. doi: 10.3389/fmicb.2018.01065. eCollection 2018.
- Lopez-Goni, D., Garcia-Yoldi, Marin C.M., de Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M. - Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**, 3484-3487.
- Mailles A., Rautureau S., Le Horgne J.M., Poignet-Leroux B., d'Arnoux C., Denetière G., Faure M., Lavigne J.P., Bru J.P., Garin-Bastuji B. - Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. *Euro Surveill.*, 2012, **17**, 30.
- Marchand P., Freycon P., Herbaux J.P., Game Y., Toigo C., Gilot-Fromont E., Rossi S., Hars J. - Sociospatial structure explains marked variation in brucellosis seroprevalence in an Alpine ibex population. *Sci. Rep.*, 2017, **7**(1), 15592.
- Maudet C., Miller C., Bassano B., Breitenmoser-Wursten C., Gauthier D., Obexer-Ruff G. - Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex* (ibex)]. *Mol. Ecol.*, 2002, **11**, 421-436.
- Mick V., Le Carrou G., Corde Y., Game Y., Jaÿ M., Garin-Bastuji B. - *Brucella melitensis* in France: persistence in wildlife and probable spillover from Alpine ibex to domestic animals. *PLoS One*, 2014, **9**(4), e94168.
- Morel P.A., Oriss T.B. - Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit. Rev. Immunol.*, 1998, **18**, 275-303.
- Muñoz P.M., de Miguel M.J., Grilló M.J., Marín C.M., Barberán M., Blasco J.M. - Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev.1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, 2008, **26**(21), 2562-2569.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine - Revisiting Brucellosis in the Greater Yellowstone Area. The National Academies Press, Washington DC (É.-U.), 2017, 209 pp. Disponible sur: <http://www.nap.edu/24750> (doi: <https://doi.org/10.17226/24750>).
- Olsen S.C., Cheville N.F., Kunkle R.A., Palmer M.V., Jensen A.E. - Bacterial survival, lymph node pathology, and serological responses of bison (*Bison bison*) vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 or strain 19. *J. Wildl. Dis.*, 1997, **33**(1), 146-151.
- Olsen S.C., Fach S.J., Palmer M.V., Sacco R.E., Stoffregen W.C., Waters W.R. - Immune responses of elk to initial and booster vaccinations with *Brucella abortus* strain RB51 or 19. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2006, **13**(10), 1098-1103.
- Olsen S.C., Johnson C. - Comparison of abortion and infection after experimental challenge of pregnant bison and cattle with *Brucella abortus* strain 2308. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, **18**(12), 2075-2078.
- Olsen S.C., Kreeger T.J., Palmer M.V. - Immune responses of elk to vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Wildl. Dis.*, 2002, **38**(4), 746-751.
- Papademas P. - *Brucella*/Problems with dairy products. In *Encyclopedia of Food Microbiology*.

- Batt C.A., Patel P.D. and Robinson R.K. (Eds.), London: Academic Press, 2000, 324-328.
- Pappas G. - The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010, **36**(Suppl 1), S8-S11.
- Rossetti C.A., Arenas-Gamboa A.M., Maurizio E. - Caprine brucellosis: a historically neglected disease with significant impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, **11**(8), 17 pages. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005692>
- Santiago-Moreno J., Gomez-Brunet A., Gonzalez-Bulnes A., Malpaux B., Chemineau P. *et al.* - Seasonal ovulatory activity and plasma prolactin concentrations in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) maintained in captivity. *Reprod. Nutr. Dev.*, EDP Sciences, 2003, **43**(3), 217-224.
- Stournara A., Minas A., Bourtzi-Chatzopoulou E., Stack J., Koptopoulos G., Petridou E., Sarris K. - Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*. *Vet. Microbiol.*, 2007, **119**, 53-64.
- Verger J.M. - *B. melitensis* infection in cattle. In JM Verger, M Plommet (ed), *Brucella melitensis*, Martinus Nijhoff, Dordrecht (N.-L.), 1985, 197-203.
- OIE - World Organisation for Animal Health, 2016. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). In Terrestrial Animal Health Manual, Chapter 2.1.4. OIE, Paris, 44 p. Disponible à : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf (consulté le 17 novembre 2018).
- Xie J., Wang J., Li Z., Wang W., Pang Y., He Y. - Ontology-Based Meta-Analysis of Animal and Human Adverse Events Associated With Licensed Brucellosis Vaccines. *Front Pharmacol.* 2018, **15**, 9:503. doi: 10.3389/fphar.2018.00503. eCollection 2018.
- Zundel E., Verger J.M., Grayon M., Michel R. - Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses. *Ann. Rech. Vét.*, 1992, **23**, 177-188.
- Zuur A., Ieno E.N., Walker N., Saveliev A.A., Smith G.M. - Mixed effects models and extensions in ecology with R. Statistics for Biology and Health book series, Springer science + Business media, Springer, New York, USA, 2009, 574 pp.



Remerciements

Cette étude a été soutenue et financée par la Direction générale de l'alimentation (DGAI), Ministère de l'Agriculture et de l'alimentation (subvention n° 020602002001, 2017-104, France) et le Ministère de la Culture, de la transition écologique et solidaire (Grant n° 2102054258, France). Les auteurs souhaitent remercier les techniciens et chercheurs du parc zoologique de la Haute Touche, de l'Inra, de l'Anses, les techniciens et scientifiques du Laboratoire de Touraine (notamment José Delaval (directeur) et le personnel technique en microbiologie) et de l'Agence française de la faune et de la chasse (ONCFS) pour leur contribution à cette étude. Les auteurs remercient les directeurs de la plate-forme expérimentale d'infectiologie, le centre international des ressources microbiennes : bactéries pathogènes (CIRM-BP) et le personnel zootechnique de la PFIE (Nouzilly, France). Remerciements à Mme Nathalie Pozzi, directrice adjointe du Laboratoire national de contrôle des reproducteurs (LNCR) et son équipe technique (Maisons-Alfort, France).