

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 17 juillet 2013

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif aux
« agents interférant avec le dépistage de la tuberculose bovine »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 7 août 2012 par la Direction générale de l'alimentation pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis relative aux agents interférant avec le dépistage de la tuberculose bovine.

La saisine interroge sur les points suivants :

1 – « *Quels sont les agents pathogènes présents chez les bovins ou les causes iatrogènes (au niveau collectif) qui interfèrent de manière négative ou positive avec le dépistage de la tuberculose bovine en France et selon quels mécanismes (identification et importance) ?* »

2 – « *Dans la perspective de la mise en place de moyens de prévention de ces interférences, fournir l'information la plus contextualisée possible sur ces agents par rapport aux différentes zones où la tuberculose bovine présente un enjeu actuellement. Quels moyens de prévention (zootecniques, prophylactiques, etc.) pourraient être préconisés pour limiter ces interférences ?* »

L'avis répond à la première question de la saisine. La 2^{ème} question fera l'objet d'une nouvelle saisine, dont la DGAL précisera la teneur, après avoir pris en compte le présent avis.

CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La France est confrontée à l'apparition de nouveaux foyers de tuberculose bovine. Leur dépistage est un point crucial de la maîtrise de l'infection sur le territoire national. Plusieurs tests de dépistage de la tuberculose bovine sont utilisés sur le territoire national, chacun ayant son champ d'application spécifique. Les plus utilisés sont les tests d'intradermo-tuberculation simple (IDS) et d'intradermo-tuberculation comparative (IDC). Dans l'un ou l'autre cas, des erreurs par excès ou par défaut peuvent apparaître, et, selon la saisine

« environ 90% des réactions non négatives observées sur les bovins testés par IDS ou IDC n'aboutissent pas au diagnostic de la tuberculose bovine, quelles que soient les investigations conduites ultérieurement », constituant ainsi « une limite importante du dispositif de lutte contre la tuberculose ».

Plusieurs avis de l'Afssa (puis de l'Anses) et de nombreuses publications mentionnent l'existence d'interférences (négatives ou positives) dans le dépistage de la tuberculose bovine en France. Le plus récent (avis de l'Anses n°2012-SA-0198 « Paratuberculose : interactions entre l'infection ou la vaccination et le dépistage de la tuberculose chez les ruminants »), analyse spécifiquement l'interférence de la vaccination contre la paratuberculose ou de l'infection paratuberculeuse avec le dépistage de la tuberculose bovine.

Mais, jusqu'à présent, aucun document n'a fait le bilan des causes pouvant entraîner de telles interférences, ni analysé leurs importances relatives.

Dans ce contexte, et suite à la publication d'un article démontrant l'impact de la fasciolose sur le dépistage de la tuberculose bovine, la DGAL a saisi l'Anses afin d'obtenir le bilan des agents infectieux et parasitaires ou des causes iatrogènes qui peuvent être responsables de ces interférences, et la proposition des moyens permettant de limiter ces interactions.

ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé « Santé animale » (CES SANT) sur la base d'un rapport initial rédigé par cinq rapporteurs.

Des points d'étape ont été présentés en CES SANT les 13/02 et 20/03/2013. Le rapport a ensuite été étudié en CES SANT les 17/04 et 15/05/2013 et validé par ce même CES le 10/07/2013.

L'expertise a été réalisée en s'appuyant sur les éléments suivants :

- La lettre de saisine,
- Les avis de l'Afssa¹ ou de l'Anses suivants :
 - o Avis de l'Afssa n°2008-SA-0167, en date du 7 novembre 2008, relatif à l'élaboration d'un protocole pour le suivi d'un troupeau bovin infecté de tuberculose abattu partiellement en vue de sa requalification,
 - o Avis de l'Afssa n°2009-SA-0022, en date du 26 août 2009, relatif à l'évaluation du risque lié à la consommation de viandes porcines contaminées par *Mycobacterium spp.* et en particulier par *Mycobacterium avium* et l'adaptation du système d'inspection en abattoir,
 - o Avis de l'Afssa n°2009-SA-0169, en date du 27 octobre 2009, relatif à des précisions concernant l'application de l'article 39 point II de l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovins et des caprins,
 - o Avis de l'Anses n°2012-SA-0011, en date du 4 décembre 2012, relatif à l'utilisation de certains tests de diagnostic de la tuberculose bovine.

¹ L'Anses a été créée le 1^{er} juillet 2010, par fusion de l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) et de l'Afssset (Agence française de sécurité sanitaire, de l'environnement et du travail).

Première partie : caractéristiques intrinsèques et performances du test interféron gamma,

- o Avis de l'Anses n°2012-SA-0198, en date du 6 février 2013, relatif à la paratuberculose : interactions entre l'infection ou la vaccination et le dépistage de la tuberculose chez les ruminants,
 - Les publications scientifiques, citées en fin de rapport,
 - Les réunions de travail entre les rapporteurs (les 12/11, 20/11, 11/12, 18/12/2012 et 14/01, 30/01 et 28/02/2013).

ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

La mémoire immunitaire est la capacité du système immunitaire à répondre de façon plus rapide et plus intense vis-à-vis d'un ou de plusieurs antigènes, et par extension vis-à-vis d'un (ou plusieurs) agent(s) pathogène(s) rencontré(s) précédemment. Cette particularité est utilisée pour le dépistage de la tuberculose bovine : les tests ont été développés dans l'objectif de révéler la présence d'une immunité cellulaire chez des bovins préalablement exposés à l'une et/ou à l'autre des mycobactéries tuberculeuses.

Les principaux tests utilisés dans le dépistage de la tuberculose reposent sur l'injection intradermique de tuberculine (aussi appelée intradermo-tuberculation), qui peut être simple (IDS), si la seule tuberculine bovine est injectée, ou comparative (IDC), si les tuberculines bovine et aviaire (tuberculines PPD_b et PPD_a) sont injectées simultanément. L'injection provoque, en cas d'exposition préalable à une mycobactérie notamment agent de tuberculose, une réaction d'hypersensibilité retardée au point d'injection qui est associée à une activation de lymphocytes T mémoires, spécifiques de courtes séquences peptidiques (présentes au sein des protéines mycobactériennes). En réponse à la stimulation antigénique, les lymphocytes se multiplient, et produisent différentes cytokines dont l'interféron gamma (IFN γ).

Compte tenu de la complexité des mécanismes de défense immunitaire, plusieurs interactions sont envisageables. Ainsi, l'activation lymphocytaire peut ne pas être spécifique de *Mycobacterium bovis* ou *M. avium* lorsqu'il existe une immunité préalable vis-à-vis d'antigènes ou d'épitopes partagés avec d'autres bactéries, et notamment des mycobactéries.

Par ailleurs, des cellules dites régulatrices peuvent dans certains cas inhiber l'activation lymphocytaire conduisant à une diminution, voire à une absence de réponse à l'IDS, alors que la production d'IFN γ n'est pas modifiée (Coad *et al.* 2010).

Les facteurs augmentant l'occurrence de réactions par excès (faux positifs) ou par défaut (faux négatifs) de ces tests de dépistage de la tuberculose bovine, ont été récapitulés par De la Rua-Domenech *et al.* (2006).

Parmi ces facteurs, le présent avis s'est concentré sur les infestations parasitaires, les infections concomitantes et les causes iatrogènes qui modifient la réponse immunitaire à *M. bovis*.

La réponse à la première question de la saisine a été réalisée sur la base de la littérature scientifique disponible. Les experts ont analysé successivement les différentes causes possibles d'interférences aujourd'hui documentées dans les domaines suivants :

- 1- Infestations parasitaires
- 2- Infections virales
- 3- Infections bactériennes
- 4- Causes iatrogènes

1. Infestations parasitaires interférant avec le dépistage de la tuberculose

De manière générale, les interactions entre infestations parasitaires et infections bactériennes sont très complexes et ont fait l'objet de nombreux travaux dans différents modèles animaux/agents pathogènes. Les helminthes sont connus pour avoir des effets modulateurs sur le développement des réactions immunes (Mc Sorley *et al.*, 2012), pouvant ainsi potentiellement interférer négativement avec les réactions de l'organisme vis-à-vis d'autres agents pathogènes, tels que les bactéries ou les protozoaires.

Ce phénomène a notamment été mis en évidence lors d'infestation par des helminthes chez l'homme (conséquences de l'infestation par le nématode *Onchocerca volvulus* sur l'évolution de l'infection à *M. tuberculosis* et *M. lepræ* [Stewart 1999]), chez la souris (mort des sujets co-infectés par *Fasciola hepatica* et *Bordetella pertussis* [Brady 1999 et Mulcahy 2005]) et chez le porc (diminution de l'efficacité vaccinale contre *M. hyopneumoniae*, en cas de co-infection par *Ascaris suum* [Steenhard *et al.*, 2009]).

L'effet négatif sur le développement des réactions immunes a également été rapporté chez l'enfant : retard dans l'acquisition de l'immunité de protection contre le paludisme, lors d'infestation par le nématode *Ascaris suum* (Dhruile, 2005).

En modulant la réponse immunitaire, les infestations parasitaires pourraient modifier la sensibilité ou la spécificité des tests de dépistage de la tuberculose.

Les seules publications relatant des interférences entre infestation parasitaire et dépistage de la tuberculose concernent la grande douve, *Fasciola hepatica*. Elles font état, soit d'une diminution de la spécificité des tests pour les plus anciennes, soit d'une diminution de la sensibilité des tests pour les plus récentes (Flynn *et al.*, 2007 et 2009, Claridge *et al.*, 2012).

Il est nécessaire, au préalable, de rappeler le contexte épidémiologique d'infestation par ce parasite, et les conséquences immunitaires des différents modes d'infection :

Lors d'une enquête réalisée en 2005 (Alzieu *et al.* 2005), 1 261 génisses ou jeunes vaches de toutes les grandes régions d'élevage ont subi un prélèvement de matières fécales et une prise de sang pour le dépistage de la fasciolose. Dans 20 % des 132 cheptels impliqués dans l'enquête, des coproscopies se sont révélées positives indiquant que l'infestation est active et le risque élevé nécessitant un traitement immédiat. Dans 90 % des cheptels, plus de la moitié des sérologies individuelles par ELISA étaient positives. Pour 78 troupeaux (59 %), plus de la moitié des sérums présentaient des taux d'anticorps élevés.

Une seconde enquête a été réalisée en 2007 sur 520 bovins issus de 52 troupeaux répartis dans 17 départements représentant les principales régions d'élevage, la prévalence troupeau variait de 52 % (coproscopie) à 96 % (ELISA avec antigènes ES) (Alzieu *et al.*, 2007).

Ces travaux montrent qu'il existe une forte prévalence sérologique troupeau associée à un taux très faible d'infestation individuelle, confirmée aussi bien par les résultats des coproscopies individuelles que par les saisies en abattoir. De plus l'infestation individuelle est surdispersée : la majorité des individus héberge un très faible nombre de parasites (Chauvin, 2012).

Les tests ELISA-*Fasciola* utilisés sont spécifiques (95 à 98 %) et sensibles (96 à 98 %), ils sont positifs deux à six semaines après l'infestation. Plusieurs trousseaux de diagnostic sont commercialisés en Europe (Pourquier, Bio-X Diagnostic, Euroclone...) et sont utilisés couramment permettant un dépistage facile et fiable si l'on tient compte des réserves concernant la persistance d'anticorps quelques mois après le traitement des animaux (Dorchies *et al.*, 2012).

La réaction ne permet cependant pas de connaître l'importance quantitative de l'infestation chez les bovins. En effet, les anticorps persistent deux à six mois après la disparition des

parasites adultes et la positivité de l'examen indique que l'animal ou le troupeau est infesté ou l'a été, mais a pu être traité dans les deux à six mois précédents. Il est possible aussi que les anticorps détectés soient consécutifs à une infestation insuffisante pour aboutir à l'installation de douves dans les canaux biliaires. Enfin, la réceptivité des bovins est assez faible : un dixième des métacercaires ingérées atteignent le stade adulte, les autres sont détruites et libèrent donc leurs antigènes ce qui explique une réaction sérologique positive chez des animaux dont les canaux biliaires n'hébergent pas de grandes douves. Les ragondins, très souvent porteurs des grandes douves, disséminent des œufs dans le milieu extérieur mais le nombre de métacercaires produites à partir de ces sources pourrait être trop faible pour assurer l'installation d'infestations suffisamment importantes pour permettre le développement des adultes dans les canaux biliaires tout en assurant la sensibilisation des animaux et donc des réactions immunes décelées par la sérologie (Ménard *et al.*, 2001).

Compte tenu de la forte prévalence de *Fasciola hepatica* dans les troupeaux bovins français (Alzieu *et al.*, 2007 ; Chauvin *et al.*, 2012), et de la possible interférence entre l'infestation par l'agent de la grande douve et le dépistage de la tuberculose, les experts ont réalisé l'analyse critique des trois publications récentes citées ci-dessus pour répondre à la saisine. Il faut signaler par ailleurs qu'un rapport du Defra (2005) fait état de corrélations négatives entre infestation par *F. hepatica* et infection par *M. bovis*.

1-1 Diminution de la spécificité

Dans les années cinquante, les infestations par les trématodes étaient considérées, par certains auteurs, à l'origine d'erreurs par excès expliquées par une sensibilisation aspécifique. Euzéby (1971) a relaté un certain nombre de publications en faisant état. Lucas et Gayot (1967), de leur côté, les ont considérées comme insignifiantes.

Il n'est pas exclu que les douves puissent transporter des mycobactéries comme cela a été montré en Roumanie : des souches de *M. avium* ont été cultivées à partir de broyats de grandes douves (Onet *et al.*, 1978). Ces auteurs ont conclu que le transport de mycobactéries pourrait expliquer des réactions anormalement positives à la tuberculine chez des animaux sains.

1-2 Diminution de la sensibilité

Les publications de Flynn *et al.* (2007 et 2009), et Claridge *et al.* (2012) ont démontré l'existence de faux négatifs lors du dépistage de l'infection par *M. bovis* chez des bovins infestés par *F. hepatica*. Les travaux de Flynn *et al.* (2007 et 2009) ont été réalisés en conditions expérimentales, tandis que la publication de Claridge *et al.* (2012) a rapporté les résultats d'une enquête épidémiologique ainsi que ceux d'une étude expérimentale. Une analyse détaillée des protocoles et des résultats de ces publications est nécessaire.

1-2-1 Les publications et leurs résultats

- **Flynn *et al.* (2007) : L'infestation expérimentale par *Fasciola hepatica* altère la réponse aux tests de dépistage de la tuberculose bovine.**

Ce travail constitue la première expérimentation explorant l'interaction éventuelle entre l'infestation des bovins par *F. hepatica* et les tests de dépistage de la tuberculose bovine. Quatre groupes de 4/5 veaux de 6 à 9 mois ont été soit infestés uniquement par *F. hepatica* (400 métacercaires/veau), soit infestés par *F. hepatica* puis infectés par *M. bovis* souche BCG (BCG) -souche atténuée de *M. bovis* couramment utilisée en vaccination humaine- 4 semaines plus tard (10⁶ UFC en sous-cutané [SC]), ou à l'inverse infectés par le BCG puis infestés par *F. hepatica* 4 semaines plus tard. Un quatrième lot n'a reçu que le BCG. Des tuberculinations par IDC ont été faites pour chaque lot 13

semaines après inoculation de BCG. Des tests IFN γ (Bovigam®) ont été réalisés le même jour. Tous les animaux ont été abattus à la 17^{ème} semaine, pour réaliser un bilan parasitaire. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1.

L'interprétation de l'IDC s'appuie sur la directive européenne, celui de l'IFN γ sur la publication de Gormley *et al.* (2006).

Tableau 1 : Résultats comparatifs entre IDC et IFN γ obtenus 13 semaines après inoculation par le BCG

Lots	Nombre d'animaux	Charge parasitaire (nombre de douves) Moyenne (+/- écart-type)	Nombre d'animaux			
			Test IFN γ sang total		IDC	
			Positif	Négatif	Positive	Négative
1 : <i>F. hepatica</i> seul	4	26±4	-	4 ^a	-	4 ^a
2 : <i>F. hepatica</i> et BCG	4	15±3	-	4 ^a	-	4 ^a
3 : BCG et <i>F. hepatica</i>	5	8±5	1	4 ^a	2	3 ^a
4 : BCG	5	-	4	1	4	1

a = significativement différent de celui du lot BCG seul

Lorsque les animaux ont été infestés par *F. hepatica* puis inoculés par le BCG, le résultat de l'IDC a été négatif sur l'ensemble des veaux (4/4). Lorsque les animaux ont été inoculés par le BCG puis infestés par *F. hepatica*, 3 animaux sur 5 ont été négatifs en IDC. Ceci est à comparer aux 4 animaux sur 5 positifs en IDC après inoculation au BCG, ce qui montre une réduction importante du dépistage de la tuberculose par l'IDC. Les résultats ont été quasi-identiques pour le test IFN γ : la réduction dans le dépistage de la tuberculose a été forte.

Au cours de cet essai d'autres cytokines ont été mesurées et les résultats sont plus complexes à interpréter. L'IL-4, cytokine majeure de la réaction immunitaire aux helminthes (Th2), semble présenter des valeurs plus élevées en semaine 13, au moment des tests, chez les animaux co-infestés/infestés par rapport aux sujets ayant seulement reçu le BCG. Pour les auteurs, l'infestation par les douves entraînerait une réponse immunitaire orientée Th2 se traduisant par une élévation d'IL-4 et une baisse de l'IFN γ , (cytokine majeure de la voie Th1) au moment où les tests de dépistage ont été réalisés (13 semaines post BCG) et une possibilité d'erreur par défaut de tout ou partie des tests.

Au terme de l'essai (17 semaines), les auteurs ont enregistré un nombre de douves variable selon les groupes (*cf.* tableau 1). La faible charge parasitaire moyenne dans le lot 3 pourrait suggérer une diminution de réceptivité des veaux vis-à-vis des métacercaires de *F. hepatica* lors d'inoculation préalable par le BCG. Toutefois, il n'y a pas de différences significatives dans les bilans parasitaires selon les groupes, et le taux d'installation des métacercaires est globalement très faible.

- **Flynn *et al.* (2009) : Conséquences immunitaires d'une infestation par *Fasciola hepatica* sur une infection à *Mycobacterium bovis* chez les bovins**

Cette étude complète la précédente en remplaçant le BCG par une épreuve virulente avec *M. bovis* par voie aérienne.

Trois groupes de 6 veaux de 8 mois ont été utilisés dans cet essai.

Les animaux du premier groupe ont reçu chacun 150 métacercaires de *F. hepatica*.

Ceux du deuxième groupe ont reçu chacun 150 métacercaires de *F. hepatica* puis ont été infectés par *M. bovis* (dose effective de 800 UFC) quatre semaines plus tard.

Le troisième groupe a été infecté uniquement par *M. bovis* (dose effective de 800 UFC).

Le dosage des cytokines suivantes a été réalisé toutes les semaines jusqu'à l'abattage à 14 semaines : IFN γ , IL-4, TGF- β après stimulation avec différents antigènes. Tous les animaux ont été abattus 14 semaines après le début de l'expérimentation (correspondant à l'infestation par la douve) pour bilan parasitaire et recherche de lésions tuberculeuses.

La réponse en IFN γ (PPDb-PPDa) a été significativement inférieure chez les animaux co-infectés/infestés par rapport aux animaux infectés par *M. bovis* seul et en semaines 7, 8 et 9 après l'infestation par *F. hepatica* soit 3, 4 et 5 semaines suivant l'infection par *M. bovis* (non significatif avec les antigènes ESAT-6 et CFP-10²).

Les auteurs ont noté une réponse en IL-4 (PPDb) supérieure chez les co-infectés/infestés par rapport à *M. bovis* seul à 7 et 13 semaines après l'infection. La même tendance a été observée pour TGF- β .

À l'autopsie, le nombre moyen de douves a varié de 53 à 81 sans différences significatives entre les co-infectés/infestés ou non.

Dans le lot *M. bovis* seul, 6 veaux sur 6 ont été infectés et 5 ont présenté des lésions tuberculeuses tandis que dans le lot *F. hepatica* + *M. bovis*, 5 veaux sur 6 ont été infectés et 3 ont présenté des lésions tuberculeuses. Ces différences pourraient suggérer une réceptivité (pourcentage d'infection) et/ou une sensibilité (pourcentage de lésions) plus faibles à *M. bovis* chez les veaux préalablement infestés par *F. hepatica*. Toutefois, ces différences présentées dans cette publication ne sont pas statistiquement significatives.

Les résultats de ce travail impliquant *M. bovis* vont dans le même sens que ceux de l'étude précédente à savoir une modification de la réponse immune aux dépens de la réponse Th1. La réduction de la réponse spécifique en IFN γ chez les animaux co-infectés/infestés par *F. hepatica* a été constatée dans cette étude entre 3 à 5 semaines après l'infection par *M. bovis* au moment où les douves sont âgées de 7 à 9 semaines et peuvent être qualifiées d'immatures « tardives » (la période prépatente de *F. hepatica* chez les bovins est de 12 semaines). De manière non statistiquement significative, la réceptivité/sensibilité à *M. bovis* pourrait être diminuée lors d'infestation préalable par *F. hepatica*.

- **Claridge et al. (2012) : *Fasciola hepatica* est associée à la diminution de la détection de la tuberculose bovine dans les troupeaux**

Cette publication comporte deux parties : une partie expérimentale qui relate les résultats d'une infestation de jeunes bovins par *F. hepatica* et/ou *M. bovis* et une partie d'analyse de modèles épidémiologiques visant à montrer l'impact de l'infestation parasitaire sur le résultat des tests de dépistage de la tuberculose.

Partie expérimentale

Deux groupes de six veaux de 5 à 6 mois ont été utilisés, le groupe A a été consécutivement infesté avec 150 métacercaires puis infecté par *M. bovis* 4 semaines plus tard (environ 500 UFC par veau) et le groupe B a été uniquement infecté par *M. bovis* (environ 500 UFC par veau).

Les animaux ont été testés par une IDC 10 et 21 semaines après l'infection par *M. bovis*. L'essai ne mentionne ni dosage de l'IFN γ , ni résultats d'examen nécropsiques.

Les résultats des tests de dépistage par intradermo-tuberculation sont rassemblés dans le tableau 2.

² - ESAT-6: 6 kDa early secretory antigenic target ; CFP-10 : 10-kDa culture filtrate protein.

Tableau 2 : Résultats individuels de l'IDC (exprimés en mm ; différentiel entre le delta obtenu pour la tuberculine PPDb et le delta obtenu pour la tuberculine PPDa) (Claridge *et al.*, 2012)

Groupe A : co-infectés/infestés par <i>Fh</i> puis par <i>Mb</i>			Groupe B : infectés par <i>Mb</i> seul		
Numéro des sujets	Semaine 10	Semaine 21	Numéro des sujets	Semaine 10	Semaine 21
1- <i>Fh+Mb</i>	15	7	7- <i>Mb</i>	27	14
2- <i>Fh+Mb</i>	17	6	8- <i>Mb</i> .	26	12
3- <i>Fh+Mb</i>	13	7	9- <i>Mb</i>	30	25
4- <i>Fh+Mb</i>	9	7	10- <i>Mb</i> .	10	4
5- <i>Fh+Mb</i>	21	14	11- <i>Mb</i>	25	18
6- <i>Fh+Mb</i>	12	8	12- <i>Mb</i>	31	12
Moyenne (écart-type)	14,5 (4,18)	8,16 (2,93)	Moyenne (écart-type)	24,8 (7,62)	14,17 (6,99)

Fh : *Fasciola hepatica*

Mb : *M. bovis*

Les valeurs obtenues chez les animaux infestés par *F. hepatica* puis infectés par *M. bovis* ont été significativement inférieures à celles obtenues chez les animaux infectés seulement par *M. bovis* à 10 et 21 semaines après l'infection (14,5 versus 24,8 mm et 8,16 versus 14,17 mm respectivement). Cependant, tous les résultats ont été positifs au seuil d'interprétation de l'IDC de 4 mm.

Analyse de modèles épidémiologiques

Cette publication relate les résultats du test de dépistage IDC de la tuberculose confrontés à ceux du test ELISA-*F. hepatica* sur lait de mélange (Antigène Pourquoiier)³ dans 3 026 troupeaux de Grande-Bretagne entre le 01/01/2004 et le 31/12/2007. Une première analyse statistique prenant en compte les corrélations spatiales de la prévalence des élevages détectés positifs à l'IDC (au moins un animal positif) et des résultats ELISA-*F. hepatica* a été réalisée. Cette analyse a permis de décrire mathématiquement la répartition spatiale des deux événements et d'identifier des regroupements spatiaux (agrégats).

Les résultats ont montré une association spatiale négative entre la détection par l'IDC et le test positif ELISA-*F. hepatica* : dans les zones géographiques à forte prévalence en anticorps anti-*F. hepatica*, il a été constaté un faible taux de dépistage de la tuberculose par IDC et inversement. Cette association spatiale négative pourrait être expliquée par un ensemble de conditions environnementales opposées (y compris la conduite d'élevage) pour chacun de ces agents pathogènes.

Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont développé un modèle prédisant la probabilité de détection par IDC, basé sur un modèle publié antérieurement et qui a prédit correctement la présence ou l'absence des réponses positives aux tests de dépistage de

³ POURQUIER@ELISA Bovine FASCIOLOSIS Serum and Milk Verification

la tuberculose bovine en fonction d'une combinaison de variables environnementales et de variables à l'échelle des élevages comme le mouvement des animaux entre les élevages. Si la présence ou l'absence de réponses positives aux tests de dépistage de la tuberculose bovine n'a pas été affectée par *F. hepatica*, alors la variable résultat du test ELISA-*F. hepatica* ne devrait pas en principe améliorer la qualité prédictive du modèle statistique sans cette variable.

Lorsque les auteurs ont introduit la variable *F. hepatica* dans le modèle, toutes les variables sont demeurées significatives (avec changement négligeable dans les valeurs des Odds ratio). La variable *F. hepatica* a également eu un effet supplémentaire, important, négatif sur les chances de détection de la tuberculose par le test IDC (OR= 0,61 ; 95 % IC= 0,56–0,67, P < 0,001). La qualité du modèle a été jugée bonne et validée grâce à la méthode de validation croisée.

Selon ce modèle, en l'absence hypothétique de *F. hepatica*, le pourcentage d'IDC positifs dans les fermes de l'étude serait passé de 35,5 à 53 %, soit en valeur absolue une différence de 17,5 % (IC à 95 %, 14,5–20,4 %) et en valeur relative une différence de l'ordre de 50%.

Au terme de cette enquête épidémiologique qui a concerné 3 026 troupeaux laitiers, les auteurs ont constaté une diminution de la fréquence de la réaction positive à l'IDC dans les troupeaux à fort titre en anticorps anti-*F. hepatica*. Ils ont émis l'hypothèse d'une diminution de la sensibilité de l'IDC chez les animaux infestés par *F. hepatica*. Cette hypothèse est appuyée par les résultats de l'étude expérimentale.

1-2-2 Discussion générale des travaux publiés

- Pour la partie expérimentale de ces trois études, les modalités d'infestation par *F. hepatica* ont été assez comparables (150 à 400 métacercaires) mais ont abouti à des résultats très variables en termes d'installation parasitaire (de 2 à 35 %). Cette variabilité peut être expliquée par des facteurs liés à la différence de pouvoir infestant des métacercaires utilisées ou à la réceptivité des hôtes. Elle ne remet cependant pas en cause la validité des études. En outre, malgré cette variabilité, les résultats des trois études sont cohérents.
- L'interaction avec les tests de dépistage a été étudiée lors d'infestations par des stades parasitaires immatures (7 à 9 semaines) ou adulte (17 à 25 semaines) mais suite à une infestation unique par *F. hepatica*. Ce modèle expérimental est éloigné des conditions d'infestation naturelle par *F. hepatica* dans lesquelles les animaux ingèrent de façon répétée des métacercaires (surinfestations) et hébergent en général les parasites sur de très longues périodes (infestation chronique). Toutefois, il a été montré que les réactions immunitaires au cours des primo-infestations et des sur-infestations semblaient être de même nature : en effet, l'orientation Th0/Th1 vers Th2 déjà perceptible lors de primo-infestation s'accroît lors de sur-infestation (Clery *et al.*, 1996). Le modèle évalue par ailleurs l'interaction avec les tests de dépistage sur une période limitée à quelques semaines et n'explore pas les réponses ultérieures, au cours de la phase chronique de l'infestation parasitaire.
- L'étude épidémiologique est basée sur un test ELISA dont la sensibilité est faible. Ceci tient à deux raisons : d'une part, la faiblesse de la sensibilité au plan individuel, ne permettant de détecter que les animaux hébergeant plus de 4 douves (soit 10% des bovins infestés) (Chauvin, 2012). D'autre part, l'application de ce test au lait de mélange (effet de dilution) diminue également la sensibilité à l'échelle du troupeau. Il y a donc un biais, c'est-à-dire une erreur systématique dans l'estimation d'une association entre la maladie et un ou plusieurs facteurs

d'exposition, ce biais pouvant être qualifié de biais de classement⁴. Dans le cas où les biais de classement sont non différentiels⁵, ils ont des répercussions sur la puissance statistique de l'étude, en entraînant une sous-estimation de l'association entre les paramètres étudiés.

Dans l'étude de Claridge *et al.* (2012), les erreurs de diagnostic peuvent être assimilées à des biais de classement non différentiels car le manque de sensibilité du test ELISA-*F. hepatica* sur lait de mélange peut être considéré comme indépendant du statut de l'élevage vis-à-vis de la tuberculose. Cependant, malgré ce biais de classement (dont la présence entraîne une sous-estimation des relations entre les paramètres observés), l'étude a permis de mettre en évidence une association statistiquement significative entre la prévalence d'animaux positifs à l'IDC et le titre du test ELISA-*F. hepatica* sur lait de mélange. Il peut donc être conclu que l'association réelle entre ces deux facteurs est *a minima* équivalente à celle qui a été mise en évidence dans cette étude.

L'existence d'une association négative entre une sérologie positive vis-à-vis de *F. hepatica* et une IDC positive, mise en évidence par l'article de Claridge *et al.* (2012), ne peut donc être remise en question.

Une telle association pourrait recouvrir deux situations différentes :

- Diminution de la sensibilité des tests de dépistage de la tuberculose bovine lors de co-infection/infestation par *F. hepatica*

C'est l'hypothèse émise par Claridge *et al.* (2012). Elle pourrait reposer sur les effets immunomodulateurs de *F. hepatica*, et notamment la baisse des réponses immunitaires cellulaires chez des individus secondairement infectés par *M. bovis*.

Dans les trois études, il y a eu une homogénéité dans la baisse d'intensité des réactions pour les tests d'intradermo-tuberculination et de dosage de l'IFN γ , ceci semblant en partie lié à une production supérieure en IL-4 qui est habituelle dans ce type d'infestation parasitaire.

La portée de ces résultats expérimentaux pour le dépistage de la tuberculose bovine des animaux naturellement co-infectés/infestés sur le terrain est impossible à estimer en raison de la diversité des modalités d'infestation naturelle par *F. hepatica* et de l'ampleur et l'évolution non prévisibles des interférences. De ce fait, l'impact de la diminution éventuelle de sensibilité aux tests de dépistage de la tuberculose ne peut pas être quantitativement évalué.

Cependant, dans l'étude épidémiologique, l'impact de *F. hepatica* sur le dépistage de la tuberculose bovine se traduirait par une diminution relative de la fréquence d'IDC positive (à l'échelle individuelle) de l'ordre de 50%.

- Diminution de la réceptivité/sensibilité vis-à-vis de *M. bovis* lors de co-infection/infestation par *F. hepatica*.

Une hypothèse, évoquée partiellement par Claridge *et al.* (2012), sous-tendrait que des animaux tuberculeux ou infestés de douves seraient moins réceptifs aux infestations/infections par l'autre agent pathogène. Beaucoup moins exploré au plan biologique, ce mécanisme n'est peut-être pas à écarter. Les données d'installation des douves dans l'expérience de Flynn *et al.* (2007) et celles concernant le taux de lésions tuberculeuses dans l'expérience de Flynn *et al.* (2009) iraient peut-être dans le même sens.

⁴ On distingue généralement trois types de biais : les biais de sélection qui concernent la sélection des échantillons de l'étude, les biais de classement qui désignent une erreur systématique de la mesure de l'exposition ou de la maladie et conduisent à mal classer les individus de l'étude en malades/non malades ou en exposés/non exposés, et les biais de confusion qui correspondent à une erreur sur la mesure d'association entre un facteur étudié et la maladie due à la non prise en compte d'un facteur de confusion. Un facteur de confusion est un facteur associé à la fois à l'exposition et à la maladie.

⁵ Les biais de classement peuvent être différentiels (probabilité d'erreur de classement différente selon les groupes) ou non différentiels (probabilité d'erreur de classement comparables d'un groupe à l'autre).

Dans un rapport du Defra (2005), l'examen de 200 bovins réagissant à l'IDC issus de troupeaux nouvellement détectés en tuberculose et de 200 autres bovins non réagissants mais issus de troupeaux à historique de tuberculose a montré une corrélation statistiquement négative entre la séropositivité individuelle à *Fasciola* et la tuberculose confirmée chez les bovins. Cette corrélation est également en faveur d'une diminution de la réceptivité à *M. bovis* chez les bovins parasités par *F. hepatica* ou une diminution de la réceptivité à *F. hepatica* chez les bovins infectés par *M. bovis*. Les résultats de l'étude du Defra (2005) suggèrent donc une hypothèse alternative pour expliquer l'association négative IDC et ELISA-*F. hepatica* constatée sur le terrain : l'infection ou l'infestation par l'un des deux agents pathogènes diminuerait la probabilité pour un bovin d'être infecté ou infesté par l'autre agent.

En conclusion, les publications présentées ci-dessus, bien qu'éloignées des conditions naturelles d'infestation/infection par *F. hepatica* et *M. bovis* (variabilité de l'installation parasitaire, infestation ponctuelle, etc.) ont montré une cohérence dans les résultats et des tendances transposables aux diverses situations rencontrées sur le terrain, dans les interactions entre l'infestation par *F. hepatica* et le dépistage de la tuberculose bovine par IDC ou par le test IFN γ .

Lors d'infections expérimentales par le BCG ou *M. bovis*, les réponses en IDC ou en IFN γ ont été diminuées chez les animaux co-infestés par *F. hepatica* : cet effet a été constaté entre 3 et 20 semaines après l'inoculation du BCG ou de *M. bovis* et s'est traduit par une diminution de la sensibilité des tests de dépistage.

L'étude épidémiologique a par ailleurs montré une association négative entre la détection par l'IDC et le test positif ELISA-*F. hepatica*. Celle-ci peut être interprétée comme la conséquence d'une diminution de sensibilité de l'IDC lors de co-infestation avec *F. hepatica*, tout en n'excluant pas la possibilité que l'infection/infestation par l'un des deux agents puisse diminuer la probabilité d'être infecté/infesté par l'autre.

2. Infections virales interférant avec le dépistage de la tuberculose

La protection contre les infections virales fait appel à l'immunité innée et adaptative (Foucras, 2008). La qualité et l'intensité de la réponse immunitaire adaptative est en partie dépendante de la nature de la réponse des lymphocytes T CD4+ auxiliaires (de type Th1 et Th2). Suite à une infection virale, la réponse cellulaire auxiliaire est le plus souvent de type Th1, les principaux effecteurs de la protection étant alors les anticorps neutralisants et les lymphocytes T cytotoxiques. Cette réponse de type Th1 est notamment caractérisée par la production des cytokines de types IFN γ et IL-12. Dans certaines conditions, rares et encore mal caractérisées chez les bovins, les interactions virus-cellules de l'immunité peuvent aboutir à une réponse dite Th2. C'est le cas par exemple de l'infection par le virus respiratoire syncytial bovin où la réponse de type Th2 se traduit par la production d'IL-4, d'IL-5, et de cytokines pro-inflammatoires au détriment d'une réponse cytotoxique CD8+ (Gershwin *et al.*, 2012). Ces réponses de type Th2 sont d'occurrence faible dans les conditions de terrain et il n'existe aucune donnée et aucune preuve qu'elles puissent interférer avec la réponse immunitaire induite lors d'un test de dépistage de la tuberculose.

Chez les bovins, plusieurs virus peuvent être responsables de déficit immunitaire. Toutefois, les principaux virus dont la pathogénie décrite peut théoriquement induire une interférence sont ceux de la maladie des muqueuses (virus BVD-MD), de la rhinotrachéite infectieuse bovine, de l'immunodéficience bovine et de la leucose bovine.

Les effets sur le système immunitaire de ces virus sont essentiellement consécutifs à : une déplétion des lymphocytes, ou lymphopénie observée dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires, ou à une lymphocytose persistante due à la prolifération des lymphocytes B.

À ce jour, seul le virus BVD-MD a fait l'objet d'une étude publiée sur l'interférence éventuelle dans le dépistage de la tuberculose bovine (Charleston *et al.*, 2001).

2-1 Le pestivirus bovin (virus BVD-MD)

Le virus BVD-MD existe sur les 5 continents. Tous les bovins sont réceptifs à l'infection, mais tous ne sont pas sensibles de la même façon et certains animaux au sein d'un troupeau pourraient être naturellement peu réceptifs à l'infection virale. À noter par ailleurs l'existence de veaux IPI (infectés persistants immunotolérants) lorsque l'infection *in utero* intervient entre le 45^{ème} et le 125^{ème} jour de gestation. Enfin, la séoprévalence individuelle est très dépendante de conditions locales, puisque, estimée à 50% en France, elle recouvre de grandes disparités. La prévalence des IPI est comprise entre 0 et 2 %, alors que les fœtus infectés durant toute la gestation seraient entre 8 et 20 % (Frey *et al.*, 1996, Schreiber *et al.*, 1999). Il faut donc supposer que l'infection tue un grand nombre de fœtus, ou aboutit à la naissance de veaux séropositifs viables après la naissance.

Quand elle aboutit à la naissance de veaux IPI, la surinfection de ces veaux avec un virus cytopathogène proche du point de vue antigénique est à l'origine de la maladie des muqueuses.

15 à 50% des troupeaux comprendraient au moins un animal IPI, 70 à 95% des troupeaux hébergeraient plusieurs bovins séropositifs. Dans des troupeaux en cours d'assainissement, la prévalence des vaches ou génisses porteuses d'un fœtus IPI a été évaluée à 13% des femelles séropositives (Lindberg *et al.*, 2001). La prévalence des animaux IPI varie peu dans les régions où l'infection est présente de façon enzootique : environ 1 à 2% des animaux y sont IPI (Fourichon *et al.*, 2003, Frey *et al.*, 1996, Schreiber *et al.*, 1999).

Le virus BVD présente un tropisme pour les cellules épithéliales et les cellules mononucléées sanguines (Welsh *et al.*, 1995). L'infection des animaux immunocompétents par les souches non cytopathogènes (ncp) se traduit par une infection aiguë transitoire. Une leucopénie transitoire est fréquente chez les veaux (Potgieter, 1995), celle-ci s'accompagnant également de nombreuses autres modifications immunitaires chez l'animal (présentées par la suite). Sur le terrain, les infections par les souches ncp sont de loin les plus importantes d'un point de vue épidémiologique (Nettleton et Entrican, 1995).

Une publication de Charleston (2001) explore l'effet d'une infection transitoire par une souche ncp du virus BVD-MD, sur la réponse lymphocytaire générale et spécifique aux mycobactéries chez des veaux de 8 semaines préalablement inoculés par le BCG.

Détail de l'expérimentation : à l'âge d'un jour, les veaux 3, 4 et 5, sont inoculés par voie sous-cutanée avec 10⁶ UFC de BCG Pasteur. Cinq veaux gnotobiotiques sont utilisés. Les veaux 1, 2, 3 et 4 reçoivent, à 4 semaines, par voie intra-nasale, 5x10⁶ DICT₅₀ (dose infectieuse en culture de tissus 50 %) de virus ncp BVD-MD 11429. Le veau 5 sert de contrôle non infecté.

L'infection par le pestivirus bovin provoque une immunodépression temporaire évaluée indirectement au moyen des 2 tests *in vitro*, utilisés par ailleurs, pour confirmer l'infection par *M. bovis* : les résultats du test de prolifération des lymphocytes et du test de production d'IFN γ par les cultures de leucocytes stimulés en réponse à la tuberculine PPDa et à la tuberculine PPDb, sont diminués de façon marquée.

La conclusion des auteurs est que les infections aiguës (transitoires) des bovins par les souches ncp de virus BVD-MD peuvent temporairement compromettre les tests diagnostiques utilisés pour les infections à *M. bovis* et provoquent une erreur par défaut dans l'identification des bovins tuberculeux.

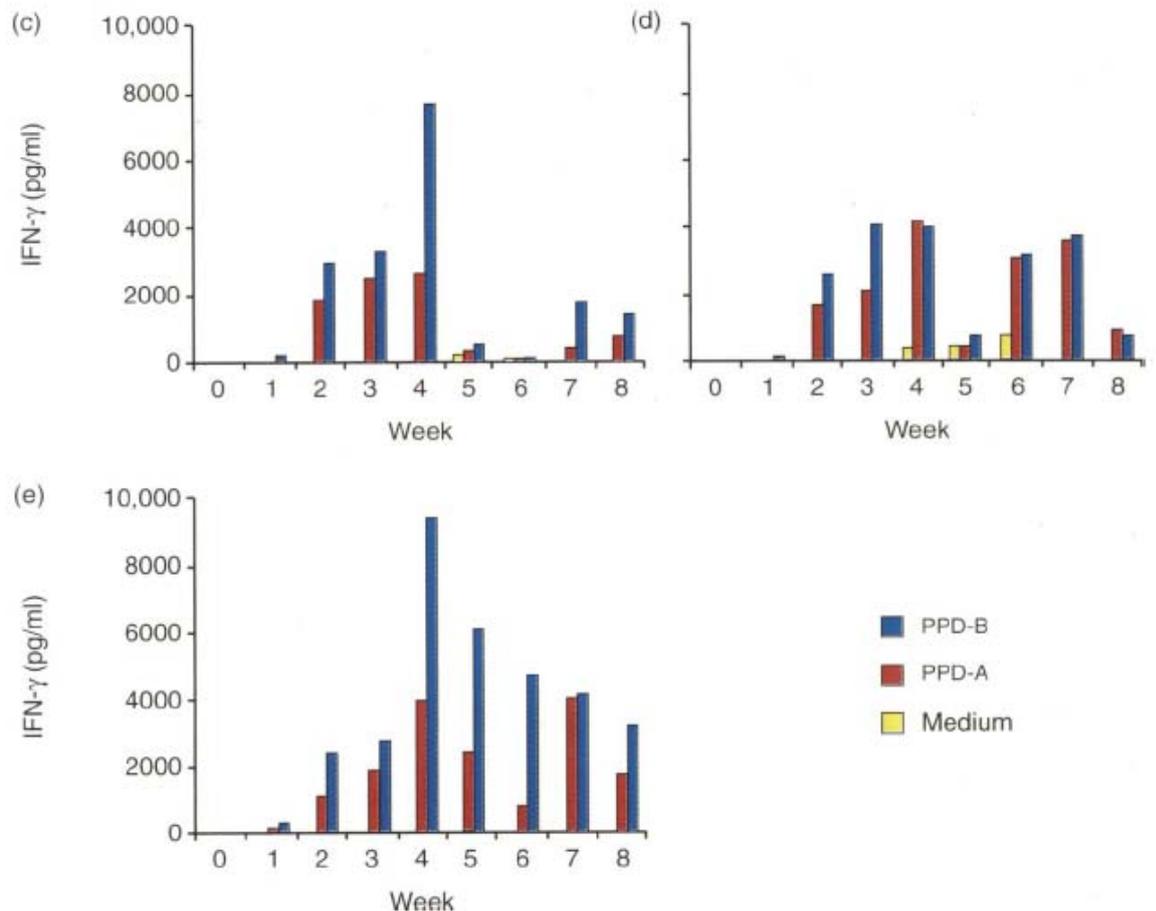


Figure 1 : Courbes de production d'IFN γ en réponse à la tuberculine PPD (et sans stimulation par la tuberculine « Medium »), chez des veaux gnotobiotiques après inoculation en semaine 4 de virus BVD-MD et de BCG (bacille Calmette Guerin) (veaux c et d) ou uniquement inoculation de BCG (veau e).

La figure 1 montre une chute des courbes de production d'IFN γ se maintenant de la semaine 5 à la semaine 8. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés par des études complémentaires. Les effets du virus BVD sur l'intradermo-tuberculination doivent être étudiés sur des bovins plus âgés.

Ces données sont également corroborées par la publication de Monies et Head (1999) sur un cas de terrain où une anergie au test de détection de l'infection par *M. bovis* ainsi que des lésions et signes cliniques non usuels ont été constatés chez des veaux infectés par le virus BVD-MD. Des évidences d'anergie ont aussi été rapportées au cours de foyers de tuberculose bovine au Royaume-Uni dans un troupeau laitier. Ce troupeau présentait une forte sérologie positive dans le lait de tank pour le virus BVD-MD mais le statut virologique du troupeau n'a pas été exploré (Houlihan *et al.*, 2008).

Une diminution de la réaction d'hypersensibilité retardée a aussi été observée par rapport à *M. avium* subsp. *paratuberculosis* à la suite d'infections transitoires par des souches ncp contenues dans des vaccins vivants atténués contre le virus BVD-MD (Thoen et Waite, 1990).

Actuellement, aucune donnée n'est disponible sur les conséquences d'une infection persistante (animaux IPI) sur la réponse aux tests de détection de l'infection par *M. bovis*.

La réponse immunitaire des bovins est modifiée suite à une infection transitoire par le virus BVD-MD dans le sens d'une immunodépression de ses deux composantes : immunités innée et adaptative.

L'immunodépression serait liée au tropisme du virus pour les cellules présentatrices d'antigènes (APC ; monocytes et cellules dendritiques) et les effets sur les macrophages et les cellules NK. Au contraire des données générées *in vitro*, les réponses en interféron (IFN) de type I (alpha et bêta) et II (gamma) sont induites en infection transitoire *in vivo* (infections expérimentales de veaux gnotobiotiques) avec une souche ncp, indiquant que l'immunodépression n'est pas associée à une faible stimulation de la réponse en IFN (Charleston *et al.*, 2002).

Au cours de la même étude, les réponses aux tests de prolifération cellulaire et de production d'IFN γ de ces veaux, préalablement inoculés avec la souche BCG, ont été évaluées (données générées en partie dans la publication déjà mentionnée ci-dessus, Charleston *et al.*, 2001) (Figure 2).

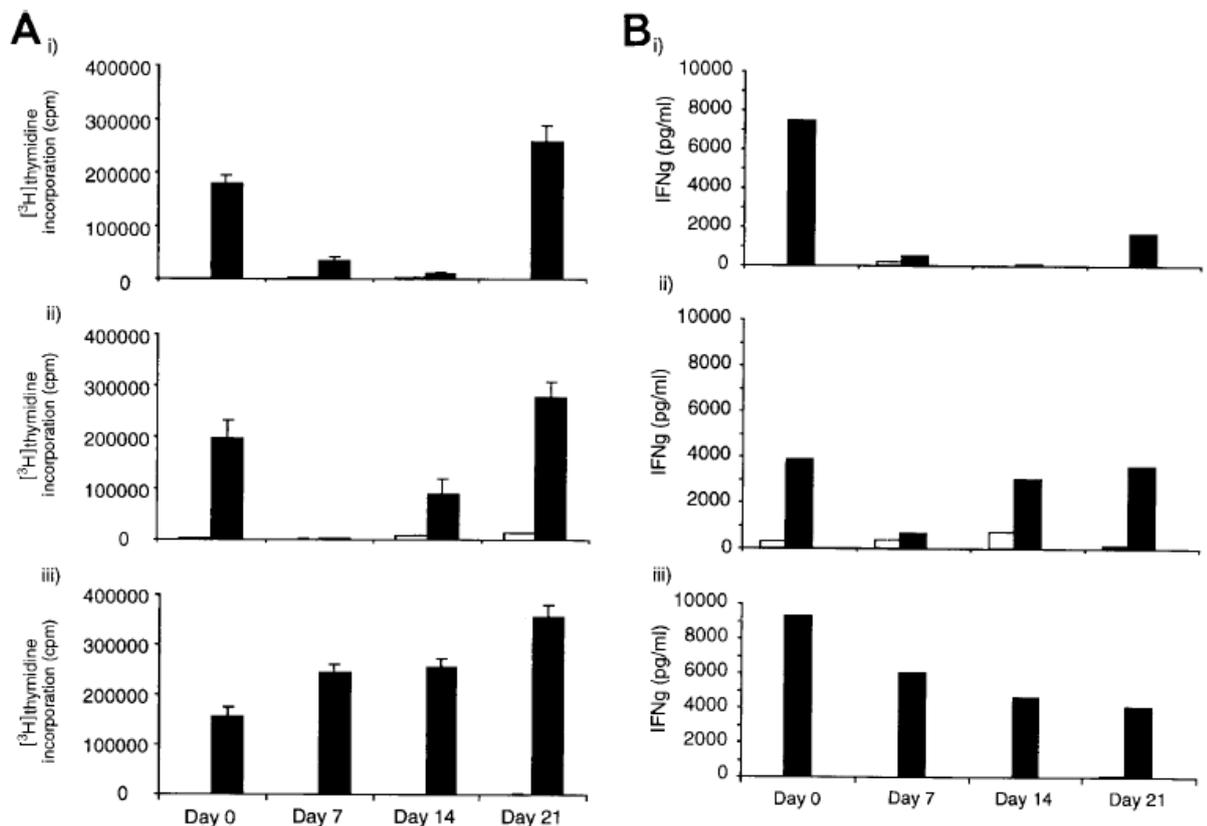


Figure 2 : test de prolifération cellulaire à la tuberculine PPD_b (A) et production d'IFN γ (B) chez des veaux infectés avec soit le BCG et le virus BVD-MD (i et ii) soit avec le BCG seul (iii). Inoculation du virus BVD-MD réalisée à j0.

Les réponses à ces tests ont été presque complètement annulées 7 jours après l'infection avec le virus BVD-MD (réponses non liées à la présence de virus infectieux résiduel dans les cultures de cellules). Des réponses normales étaient récupérées 21 jours après infection.

En infection aiguë (transitoire), une leucopénie et une neutropénie sont observées durant 7 jours. *In vitro*, le virus BVD-MD inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4+

(Brackenbury, 2003). Les données d'Archambaut *et al.* (2000) obtenues sur des veaux de 4 à 4,5 mois expérimentalement infectés, vont dans le même sens en montrant une chute du nombre de leucocytes (neutrophiles, lymphocytes et monocytes), apparaissant 3 à 5 jours après l'infection et se maintenant pendant 12 jours. Ces observations *in vitro* pourraient expliquer les faits rapportés par Charleston *et al.* (2001).

La question de l'interférence se pose également dans le cas des animaux IPI, compte tenu de leur statut immunitaire. Aucune étude n'a été réalisée sur cette catégorie de bovins infectés par le virus BVD-MD. Cependant, aucune différence significative n'a été relevée dans les dénombrements des lymphocytes totaux, lymphocytes B ou lymphocytes T CD4+ et CD8+ entre des animaux IPI et des animaux contrôles (Chase, 2013). Les données d'immunodépression constatée avec les infections transitoires ne peuvent donc sans doute pas être rapportées aux infections persistantes.

Conclusion sur la partie relative au virus BVD-MD pouvant théoriquement interférer dans le dépistage de la tuberculose bovine :

L'incidence de l'infection par le pestivirus bovin (virus BVD-MD), et son impact sur la réponse immunitaire cellulaire, en cas d'infection transitoire, en font un agent infectieux qui peut interférer négativement lors de dépistage de la tuberculose bovine. Toutefois, l'impact serait fugace car limité à la durée de l'infection transitoire et n'interfererait potentiellement que pendant 7 à 14 jours avec les tests d'intradermo-tuberculation ou le dosage de l'IFN γ .

2-2 Les autres virus pouvant théoriquement interférer dans le dépistage de la tuberculose bovine

En tenant compte de la prévalence de l'infection en France métropolitaine dans les cheptels bovins, l'herpèsvirus bovin 1, le virus de l'immunodéficience bovine et le virus de la leucose bovine seront successivement abordés.

2-2-1 Herpesvirus bovin 1 :

La rhinotrachéite infectieuse bovine (infectious bovine rhinotracheitis, IBR) est provoquée par l'herpèsvirus bovin 1 (bovine herpesvirus 1 ; BoHV1), qui s'installe à l'état latent durant toute la vie de l'animal.

En France, la situation épidémiologique au regard du BoHV1 n'est pas homogène. Le pourcentage de troupeaux (laitiers et allaitants) infectés varie nettement en fonction des départements, la prévalence moyenne nationale étant de moins de 9% en 2011 (suite à la campagne annuelle 2010 - 2011). Le taux de prévalence de la maladie est sensiblement plus bas dans les régions à vocation laitière (<http://agriculture.gouv.fr/la-rhinotracheite-infectieuse>, 2013).

Quant au nombre de cheptels qualifiés « indemnes d'IBR », il progresse lentement (Gache *et al.*, 2012).

Lors d'une primo-infection, le BoHV1 infecte les cellules épithéliales des muqueuses du lieu d'infection durant la phase aiguë, puis s'établit à l'état latent dans les ganglions nerveux drainant le site d'infection.

Le BoHV1 est capable de limiter la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte.

Au regard de la pathogénie virale, cette interférence avec le système immunitaire n'a été observée et étudiée que lors de la phase aiguë de la primo-infection, avec expression clinique ou non de la maladie.

Notamment le BoHV1 réduit l'efficacité de la réponse en interférons de type I, via l'action répressive de sa protéine bICP0 sur les protéines cellulaires IRF3 et IRF7 (Henderson *et al.*, 2005 ; Saira *et al.*, 2007). Par ailleurs, la glycoprotéine gG du BoHV1 possède une activité de type chimiokine. Quand elle est sécrétée ou ancrée à la membrane des cellules

infectées, elle réduirait l'activité de certaines chimiokines produites par l'hôte en bloquant, par compétition, leur interactions avec les récepteurs (Bryant *et al.*, 2003).

L'immunomodulation du BoHV1 sur la réponse cellulaire se traduit par une réduction du nombre de lymphocytes T circulants, une incapacité partielle des cellules mononucléées sanguines à répondre vis-à-vis d'un agent mitogène à un défaut de stimulation des cellules T par les monocytes et macrophages infectés par le virus et une incapacité des cellules T cytotoxiques à reconnaître et lyser les cellules infectées (Winkler *et al.*, 1999 ; Koopers-Lalic *et al.*, 2005). Deux mécanismes ont été clairement explicités. Le gène UL 49.5 du BoHV1 code une glycoprotéine gN qui, en inhibant la fonction de la protéine cellulaire TAP, bloque l'assemblage et la présentation des antigènes de classe I par les molécules du CMH-I, et ainsi la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (Koopers-Lalic *et al.*, 2005). Par ailleurs le BoHV1 infecte les lymphocytes T CD4+ auxiliaires, provoquant leur apoptose et/ou une baisse de l'expression des molécules CD4 à leurs membranes (Eskra et Splitter, 1997 ; Winkler *et al.*, 1999).

Toutefois, lors d'une primo-infection, le BoHV1 induit rapidement une réponse immunitaire humorale en anticorps neutralisants et une réponse cellulaire cytotoxique avec une production importante d'IFN γ (Campos *et al.*, 1989). Cela suppose que l'immunomodulation induite par le BoHV1 n'est que partielle et de courte durée, dans les quelques jours qui suivent l'infection. Par ailleurs, même si le BoHV1 est capable de moduler la réponse de l'hôte, il n'existe aucune donnée qui permette de suggérer que cette modulation interfère avec la réponse immunitaire associée aux tests de dépistage de la tuberculose.

Pendant la phase dite de latence, qui représente la majeure partie de la vie de l'animal, la réponse immunitaire au BoHV1 a été très peu étudiée. Les données récentes, obtenues pour l'herpèsvirus humain de type 1 (alphaherpèsvirus proche du BoHV1), montrent qu'il existe une infiltration permanente des cellules lymphoïdes dans le ganglion nerveux, notamment des lymphocytes CD8+ (Feldman *et al.*, 2002). Par ailleurs les lymphocytes T CD8+, producteurs d'IFN γ joueraient un rôle majeur pour prévenir la réactivation du virus (Liu *et al.*, 2001).

Il n'existe aucune donnée sur l'immunomodulation induite par le BoHV1 durant la phase de latence.

On peut supposer que, dans la mesure où il n'y a pas ou très peu de protéines virales produites lors de la phase de latence, les mécanismes décrits pour la phase aiguë sont inopérants.

2-2-2 *Lentivirus bovin (BIV)*

Le virus de l'immunodéficience bovine (BIV) appartient à la famille des *Retroviridae*, et au genre *Lentivirus* qui regroupe des virus infectant les animaux (caprine arthrits encephalitis virus, equine infectious anemia virus, feline immunodeficiency virus, simian immunodeficiency virus, Visna/Maedi virus) et l'Homme (Human immunodeficiency virus type 1 et 2) (International committee on taxonomy of viruses, 2012).

Chez ces espèces, des syndromes d'immunodéficience ont été associés à l'infection par certains de ces virus, mais ceci n'a pas été formellement démontré pour le BIV qui, comme pour tous les autres lentivirus, persiste toute la vie chez l'hôte infecté. La maladie s'exprime après une période d'incubation longue, mais chez les bovins, elle est très rarement observée du fait de la durée de vie de production de ces animaux. Cependant la séropositivité vis-à-vis du BIV a été associée à une diminution de la production laitière, une perte de poids (Mc Nab *et al.*, 1994) et aussi à une augmentation des infections secondaires bactériennes et virales (Snider *et al.*, 1997 et 2003), mais la pathogénie reste peu documentée.

Des études de séroprévalence réalisées dans de nombreux pays montrent que l'infection est répandue dans le monde entier (Belloc *et al.*, 1996). Les séroprévalences observées sont variables, de 1,4% au Pays-Bas (Horzinek *et al.*, 1991), autour de 4% en France

(Polack *et al.*, 1996) et en Pologne (Rola-Luszczacke *et al.*, 2011), de 6% en Allemagne (Muluneh *et al.*, 1994) à un peu plus de 10 % en Turquie (Yilmaz et Yesilbag, 2008), au Japon (Usui *et al.*, 2003), au Brésil (Meas *et al.*, 2002) et en Argentine (Gonzalez *et al.*, 2008). Cependant ces résultats sont difficilement comparables du fait des différences liées au nombre d'animaux prélevés, à leur âge, aux techniques sérologiques utilisées qui ne sont pas identiques d'une étude à l'autre. De même, les séroprévalences intra-troupeau sont très variables. Par exemple, une étude récente indique une prévalence intra-troupeau allant 2% à 42% dans 9 troupeaux étudiés en Argentine (Gonzalez *et al.*, 2008).

En France, une seule étude relativement ancienne rapporte une séroprévalence individuelle de 4% (15 bovins positifs sur 398 bovins les plus âgés répartis dans 37 élevages des Landes et de Vendée) (Polack *et al.*, 1996). Cette étude souligne que 22% des élevages testés présentent au moins un animal séropositif et que la séroprévalence est supérieure chez les vaches laitières par rapport aux vaches allaitantes (6% [11 positives/170 vaches laitières] versus 2% [3 positives /142 allaitantes]).

Les études de l'impact de l'infection par le BIV sur l'immunité sont peu nombreuses et ont toutes été réalisées sur un nombre réduit d'animaux avec des résultats parfois contradictoires. En effet, Flaming *et al.* (1993) rapportent une augmentation de la prolifération des lymphocytes aux agents mitogènes (PHA= phytohémmagglutinine) chez les veaux de 4 mois, alors que Martin *et al.* (1991) rapportent l'inverse. Une diminution des fonctions des monocytes et de la réponse humorale a été décrite chez des bovins infectés (Onuma *et al.*, 1992). Dans une infection expérimentale par le BIV sur 10 bovins, il est mis en évidence entre la 3^{ème} et la 7^{ème} semaine suivant l'infection une diminution des CD4+ et une augmentation des CD8+ inversant le ratio CD4/CD8 qui redevient identique au ratio observé chez les témoins non inoculés (5 bovins) dès la 8^{ème} semaine post infection (Zhang *et al.*, 1997). Dans cette même étude, les auteurs signalent que la réponse en anticorps est plus importante et apparaît plus précocement chez les bovins non infectés que chez les bovins infectés par le BIV suite à un challenge intra-nasal avec le BoHV1 réalisé 24 semaines plus tard. Ils constatent aussi des titres en anticorps plus faibles lors d'un challenge par le virus BVD-MD sur les bovins infectés par le BIV par rapport au non infectés (Zhang *et al.*, 1997).

Si, chez l'homme, l'infection par le VIH augmente le risque de contracter la tuberculose, chez le bovin aucune étude ne relate que l'infection par le lentivirus bovin augmente ce risque.

Les effets de l'infection par le BIV sur les possibilités de co-infections et sur le système immunitaire sont très peu documentés ce qui semble indiquer que ce virus a un impact très modéré sur la santé des bovins.

2-2-3 Virus de la leucose bovine

C'est un rétrovirus (genre *Deltaretrovirus*, famille des *Retroviridae*) responsable de la leucose bovine enzootique, une maladie contagieuse des bovins. Le pouvoir pathogène de ce virus est lié au tropisme viral pour les lymphocytes B. Il se développe le plus souvent sous une forme inapparente, mais peut aussi évoluer sous la forme d'un lymphosarcome multicentrique.

Avant 1988, on recensait en France environ 600 foyers annuels cliniquement exprimés (forme tumorale). La France métropolitaine est considérée comme officiellement indemne de leucose bovine enzootique (LBE) depuis 2003, à la suite d'un plan de lutte rigoureux (Fediaevsky et Perrin, 2011). L'incidence annuelle des résultats sérologiques en 2011 est inférieure à 0,01% (Rautureau et Perrin, 2012).

La situation sanitaire vis-à-vis de la LBE apparaît donc excellente et l'on peut considérer que le territoire est véritablement assaini même si quelques cas continuent à être observés sporadiquement.

Au regard de ces éléments épidémiologiques, le niveau de risque de perte de sensibilité lors du dépistage de la tuberculose bovine apparaît nul à ce jour, sauf si la leucose bovine enzootique réapparaissait en France métropolitaine.

Conclusion sur la partie relative aux autres virus que le virus BVD-MD pouvant théoriquement interférer dans le dépistage de la tuberculose bovine :

Une primo-infection par le BoHV1 peut induire une immunodépression partielle et de courte durée qui pourrait théoriquement diminuer la sensibilité des tests d'intradermo-tuberculation de la tuberculose.

Le statut indemne de la France en regard du risque de LBE permet de considérer le risque d'interférence négative avec le dépistage de la tuberculose, comme négligeable.

Même si, malgré le peu d'études documentées, on ne peut exclure un rôle ponctuel du BIV interférant négativement avec le dépistage de la tuberculose, le niveau de risque d'erreur par défaut dans le dépistage de la tuberculose bovine est négligeable.

En conclusion, compte tenu de l'absence ou de la rareté des infections dues aux virus de la leucose bovine, de l'immunodéficiência bovine et du caractère transitoire d'une immunodépression induite par l'herpèsvirus bovin 1, l'impact de ces virus peut être considéré comme négligeable.

En revanche, l'incidence de l'infection par le pestivirus bovin (virus BVD-MD), et son impact sur la réponse immunitaire cellulaire, en cas d'infection transitoire, en font un agent infectieux qui peut interférer négativement lors de dépistage de la tuberculose bovine. Toutefois, l'impact serait fugace car limité à la durée de l'infection transitoire et n'interférerait potentiellement que de 7 à 14 jours avec les tests d'intradermo-tuberculation ou avec le dosage de l'IFNy.

3. Infections bactériennes interférant avec le dépistage de la tuberculose

Les interférences bactériennes dans le dépistage allergique de la tuberculose bovine consécutives à leur proximité génétique et antigénique avec les agents de la tuberculose se manifestent de deux manières :

- L'infection bactérienne intervient sur la spécificité des tests, en la réduisant. Ce sont les « erreurs par excès », se traduisant notamment par l'observation d'IDS positive alors que les individus sont indemnes de tuberculose. Elles ne permettent pas de différencier le résultat obtenu avec un test d'intradermo-tuberculation simple ;

- L'infection bactérienne intervient sur la sensibilité des tests, en la réduisant. Ces interférences se produisent en cas de co-infection chez des bovins tuberculeux, et peuvent altérer l'efficacité du dépistage.

3-1 Baisse de la spécificité (erreurs par excès)

Réglementairement, en France, la tuberculose animale est définie comme toute infection par *M. bovis* ou *M. tuberculosis*⁶. *M. caprae* devrait prochainement être inclus dans cette liste. Ces trois agents pathogènes appartiennent au groupe des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (complexe *Mtb*, en anglais *MtbC* pour *M. tuberculosis Complex*)⁷.

⁶ Décret no 2006-178 du 17 février 2006 portant création d'une liste de maladies réputées contagieuses et modifiant le code rural et 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.

⁷ Le complexe *Mtb* comprend actuellement six pathovars (aussi qualifiés d'espèces) : *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* variété BCG (Bacille de Calmette et Guérin), *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* et *M. tuberculosis*. Au sein du

Dans la présente analyse, le qualificatif « aspécifique » (ou non spécifique) est utilisé pour les réactions consécutives à une infection par une bactérie autre que *M. bovis*, *M. caprae* ou *M. tuberculosis*.

Deux groupes de bactéries sont incriminés :

- le premier, le plus important, réunit les mycobactéries autres que celles précédemment désignées ;
- le second correspond aux agents non mycobactériens.

3-1-1. Sensibilisation par des mycobactéries tuberculeuses autres que *M. bovis*, *M. caprae* ou *M. tuberculosis* ou des mycobactéries non tuberculeuses

3-1-1-1. Sensibilisation par *Mycobacterium microti*

M. microti est un membre du complexe *Mtb* naturellement responsable d'une infection tuberculeuse des petits rongeurs (campagnol, mulot) et des musaraignes (musaraigne commune). De rares cas d'infection ont été aussi signalés chez l'Homme et diverses espèces animales domestiques (bovin, chat, chien, porc, , poney, alpaga et lama,) et sauvages (blaireau, sanglier).

M. microti est peu pathogène pour les bovins. Quelques très rares observations ont montré qu'ils pouvaient être néanmoins infectés et éventuellement présenter des lésions détectables à l'inspection (Jahans *et al.*, 2004 ; Smith *et al.*, 2009). Ils réagissent à l'intradermo-tuberculation, et la réaction observée n'est pas différenciable de celle causée par *M. bovis*. Cette réaction n'est d'ailleurs considérée comme aspécifique que dans le contexte réglementaire.

La prévalence des infections bovines par *M. microti* est actuellement méconnue. La croissance difficile et, en tout cas, très lente de cette bactérie sur les milieux utilisés pour *M. bovis* rend quasiment impossible son isolement selon les procédures actuellement utilisées, et les tests PCR utilisés en diagnostic de routine ne permettent pas de la distinguer de *M. bovis*. Sa mise en évidence nécessite des procédures particulières et sa caractérisation implique un recours à des tests moléculaires spécifiques.

Dans l'état actuel des recherches, il est impossible de définir si l'infection par cette bactérie peut être ou non une cause d'interférence dans le dépistage de la tuberculose bovine en France.

3-1-1-2. Sensibilisation par des mycobactéries non tuberculeuses (MNT)

Les MNT (NTM en anglais pour « Non tuberculous mycobacteria », ou MOTT pour « Mycobacteria others than tuberculosis ») se définissent comme les bactéries du genre *Mycobacterium* (*M.*) autres que celles appartenant au complexe *Mtb*⁸.

Les réactions non spécifiques chez des animaux infectés par des MNT sont liées à la proximité antigénique (épitopes communs ou proches) de ces bactéries avec les mycobactéries tuberculeuses. La tuberculine PPD_b (réactif de base utilisé dans le dépistage de la tuberculose bovine) correspond à un cocktail de diverses protéines (majeures ou mineures), dont certaines, communes aux bactéries du complexe *Mtb* et aux MNT, expliquent les réactions croisées. Dans la plupart des cas cependant, une plus grande proximité antigénique des MNT avec *M. avium* explique leur plus forte réactivité vis-à-vis de la tuberculine PPD_a. Le recours à toute méthode permettant de comparer la réactivité aux tuberculines aviaire et bovine (IDC, test IFN γ type Bovigam®) favorise leur détection.

complexe *Mtb*, les proximités génétique (homologie supérieure à 99,9 %) et antigénique des différents pathovars ne permettent pas leur différenciation par les épreuves de tuberculation en cas d'infection.

⁸ En excluant *M. leprae* et *M. lepraemurium*, qui ne concernent en aucun cas les bovins.

Depuis longtemps étudié (Goret et Toma, 1967 ; Lucas et Gayot, 1967), le rôle des MNT en tant que causes d'« erreurs par excès » n'est plus à démontrer. La fréquence croissante de ces erreurs avait d'ailleurs conduit en 1963⁹ à recommander l'utilisation de l'IDC, pour en limiter les conséquences dans le cadre de la prophylaxie (Saurat, 1975).

La présente analyse ne s'attachera donc pas à la démonstration du phénomène d'interférence (dont l'importance varie selon la proximité antigénique, différente d'une espèce ou d'un groupe mycobactérien à l'autre, avec *M. bovis*). Elle vise seulement à déterminer, sur la base d'investigations récentes, les MNT les plus régulièrement incriminées dans ce phénomène. Nous distinguerons, d'une part, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, agent de la paratuberculose des ruminants, d'autre part, les autres MNT.

3-1-1-2-1. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*).

Map est une mycobactérie pathogène, inféodée aux ruminants chez lesquels elle détermine la paratuberculose. Appartenant au complexe *M. avium* (*MAC*)¹⁰, elle est une cause reconnue de réactions tuberculiques douteuses ou positives chez les bovins. L'analyse de ces interférences, déjà présentée au paragraphe 2.2 de l'avis 2012-SA-0198 « Paratuberculose : interactions entre l'infection ou la vaccination et le dépistage de la tuberculose chez les ruminants », n'est pas reprise ici.

3-1-1-2-2. MNT autres que *Map* infectant les bovins

De nombreuses espèces de mycobactéries ont été isolées, dans un contexte clinique ou non, chez les bovins. Leur liste tend à augmenter, d'une part, en raison d'investigations de plus en plus fréquentes dans le cadre du dépistage (recherches systématiques, lors des abattages diagnostiques, en présence ou non de lésions), d'autre part, en raison de l'évolution de la nomenclature des mycobactéries liée à leur caractérisation génotypique. A ce titre, d'ailleurs, il peut être aléatoire de comparer les résultats d'études anciennes (identifications phénotypiques) avec ceux plus récents où l'identification des mycobactéries est fondée sur des tests moléculaires (Hughes *et al.*, 2005).

Ces bactéries, la plupart non inféodées à un réservoir animal (ou humain) obligatoire, sont ubiquitaires et présentes dans l'environnement (dans la terre et l'eau, les poussières, sur les plantes,...). Elles peuvent contaminer l'Homme et les animaux, et certaines, pathogènes opportunistes, sont impliquées dans des infections, en particulier, chez des sujets avec des terrains favorisant, comme cela est bien décrit chez l'Homme. Leur porte d'entrée chez les bovins est habituellement digestive, comme le suggèrent, d'une part, leur isolement dans le contenu intestinal des animaux (Roussel *et al.*, 2007 ; Kankya *et al.*, 2011) et d'autre part, leur isolement fréquent, associé ou non à des lésions, dans les nœuds lymphatiques mésentériques. Certains helminthes (par leurs propriétés bactériifères) peuvent, en outre, favoriser l'introduction de mycobactéries transitant dans l'intestin des animaux (Onet *et al.*, 1978). D'autres portes d'entrée sont également possibles, par exemple cutanées ou mammaires, attestées par la découverte de lésions telles que des granulomes cutanés ou sous-cutanés, des mammites. La voie respiratoire (attestée notamment par la présence des bactéries dans les nœuds lymphatiques trachéo-bronchiques et pulmonaires) résulte vraisemblablement de l'inhalation des poussières et de l'aérosol infectieux engendrés par les investigations olfactives des bovins (Courtenay *et al.*, 2006), au pâturage comme en stabulation.

⁹- Arrêté du 14 août 1963, article 10.

¹⁰- Le complexe *M. avium* (*MAC*, pour *M. avium* complex), groupe hétérogène de mycobactéries à croissance lente, correspond principalement à deux espèces génétiquement distinctes : *M. avium* et *M. intracellulare*. *M. avium* comprend quatre sous-espèces : *avium* (*Maa*), *hominisuis* (*Mah*), *paratuberculosis* (*Map*) et *sylvaticum* (cette dernière, très proche de *Maa*, infecte presque exclusivement le pigeon ramier et n'a pas été isolée chez des bovins).

Les conditions de sensibilisation des bovins par ces bactéries sont mal connues, très peu ayant fait l'objet d'infections expérimentales. La sensibilisation est souvent décrite comme transitoire, associée à des réactions cutanées à l'intradermo-tuberculation fugaces et de faible intensité (souvent considérées douteuses à la lecture de l'IDS). Cela résulte d'une infection de courte durée, les bactéries, généralement cantonnées aux nœuds lymphatiques de la porte d'entrée, étant rapidement éliminées par les défenses immunitaires. En outre, toute infection par des MNT n'est pas systématiquement associée à l'observation d'une IDS positive chez l'animal. Lucas et Gayot (1967) citaient à ce propos une observation de Lesslie (1959) selon laquelle la fréquence des mycobactéries saprophytes sur des animaux réagissants sans lésion, évaluée à l'époque à 1%, était inférieure à la fréquence d'isolement de ces mêmes souches sur les animaux non réagissants, estimée à 2,5% à partir d'un échantillonnage de 2 500 prélèvements analysés. Il n'existe pas d'étude récente de cette nature. Chez un bovin réagissant chez lequel aucune bactérie tuberculeuse n'est mise en évidence, l'isolement d'une MNT suggère son implication possible dans la sensibilisation des animaux, sans néanmoins en constituer une preuve absolue.

Il est en outre possible que des lésions subsistent (lésions fibreuses ou calcifiées) alors que la bactérie est déjà éliminée et la réaction allergique disparue (Dvorska *et al.*, 2004). Quelques auteurs ont enfin souligné, sur la base d'infections expérimentales avec diverses MNT, l'absence de corrélation entre l'isolement par culture et la sensibilité à la tuberculine ou la présence de lésions (Corner et Pearson, 1978).

L'identification des MNT comme étant à l'origine de réactions par excès chez les bovins découle d'observations et investigations épidémiocliniques, complétées ou non par des études expérimentales (reproduction expérimentale). Elles peuvent être aussi confortées par la caractérisation d'antigènes communs (ou spécifiques) aux différents groupes bactériens.

Une liste de ces bactéries, non exhaustive, peut être tirée de quelques études récentes en France (Bret, 2011 ; Boschioli, 2013)¹¹ et autres pays d'Europe (Hughes *et al.*, 2005 ; Dvorska *et al.*, 2004 ; Vordermeier *et al.*, 2007 ; Weller *et al.*, 2009). Cette liste est retranscrite dans le tableau 3.

Des biais importants affectent cependant ces résultats. En effet, les infections bovines par des MNT ne sont pas recherchées en tant que telles et leur identification est faite par défaut, dans le cadre d'investigations destinées à confirmer ou infirmer une suspicion de tuberculose, soit chez des bovins présentant des lésions suspectes à l'abattoir, soit chez des bovins présentant des réactions non négatives (éventuellement confirmées par le recours à des IDC ou des tests IFN γ). Le choix des prélèvements à l'origine des isolats, notamment en l'absence de lésion décelable (les sites potentiels susceptibles d'héberger une mycobactérie ne sont pas tous systématiquement analysés et peuvent différer d'une étude à l'autre) influence aussi les résultats. De plus, les méthodes de dépistage mises en œuvre, systématiquement axées sur la recherche de *M. bovis*, peuvent ne pas être optimales pour d'autres mycobactéries et pourraient favoriser l'isolement de certains groupes bactériens (les plus résistants, par exemple, aux techniques de décontamination des échantillons prélevés à l'abattoir).

Quarante-trois espèces ou sous-espèces de MNT, sachant qu'une proportion variable des isolats n'a pu être (ou n'a pas été) identifiée, sont répertoriées dans le tableau 3, avec des variations selon la région et les modalités des études.

En outre plusieurs MNT d'espèces différentes peuvent coexister dans un même cheptel, y compris dans des cheptels reconnus tuberculeux (Boschioli, 2013).

La co-infection d'un même bovin par plusieurs mycobactéries est également possible.

¹¹- Données recueillies en France par le laboratoire de santé animale de l'Anses-Maisons-Alfort.

Tableau 3 : MNT identifiées dans les nœuds lymphatiques et autres tissus de bovins

	Boschioli (2013) France	Dvorska <i>et al.</i> (2004) République Tchèque	Weller <i>et al.</i> (2009) Ukraine	Hughes <i>et al.</i> (2005) Irlande du Nord	Vordermeier <i>et al.</i> (2007) Grande- Bretagne
<i>M. avium</i> (autres que <i>Map</i>)	58 (35,7%)	87 (96,7%) ¹	8 (23,5%) ²	2 (4,4%) ³	(54%) ⁴
<i>M. nonchromogenicum</i> ⁵	86 (23,8%)			23 (51%)	5/46
<i>M. aichiense</i> like	5 (1,4%)				
<i>M. arupense</i> like ⁵	2 (0,6%)				
<i>M. aurum</i>	5 (1,4%)				
<i>M. austroafricanum</i>	2 (0,6%)				
<i>M. bohemicum</i>				3 (6,7%)	
<i>M. celatum</i>					5/46
<i>M. chelonae</i>		2 (2,2%)			
<i>M. chimaera</i>	1 (0,3%)				
<i>M. chitae</i> like	5 (1,4%)				
<i>M. confluentis</i>	1 (0,3%)				
<i>M. diernhoferi</i>			4 (11,8%)		
<i>M. elephantis/rutilum</i>	3 (0,8%)				
<i>M. flavescens</i>	1 (0,3%)		3 (8,8%)		
<i>M. fortuitum</i>	3 (0,8%)		7 (20,6%)		2/46
<i>M. gordonae</i>	1 (0,3%)		1		5/46
<i>M. heckeshornense</i>	1 (0,3%)				
<i>M. holsaticum</i>	1 (0,77%)			1 (2,2%)	
<i>M. insubricum</i> like	1 (0,3%)				
<i>M. intermedium</i> ou <i>int.</i> like	7 (0,77%)				1/46
<i>M. kansasii</i>	5 (1,4%)			2 (4,4%)	22/46
<i>M. komossense</i>	1 (0,3%)				
<i>M. malmoense</i>				5 (11%)	
<i>M. monacense</i>	7 (1,9%)				
<i>M. neoaurum</i>	2 (0,6%)				
<i>M. palustre</i>				1 (2,2%)	
<i>M. peregrinum</i>	2 (0,6%)				
<i>M. phlei</i>	2 (0,6%)		2 (5,8%)		
<i>M. porcinum</i> like	1 (0,3%)				
<i>M. pulveris</i> like	2 (0,6%)				
<i>M. pyrenivorans</i>	1 (0,3%)				
<i>M. rutilum</i>	1 (0,3%)				
<i>M. scrofulaceum</i>	1 (0,77%)		1 (2,9%)		1/46
<i>M. shimoidei</i>	1 (0,3%)				1/46
<i>M. smegmatis</i>	2 (0,6%)		6		4/46
<i>M. szulgai</i>					
<i>M. terrae</i> ⁵	18(5%)	1 (1,1%)			
<i>M. thermoresistibile</i>	5 (1,4%)				
<i>M. triviale</i> like ⁵	2 (0,6%)				
<i>M. vaccae</i>	9 (2,5%)		2 (5,8%)		
<i>M. xenopi</i>	2 (0,6%)				
Autres mycobactéries ⁶	42 (11,6%)			7(15,5%)	
	361	90	34	45	46 (<i>M. avium</i> non inclus) ⁴

¹ : sur 87 isolats, 74 correspondaient à *M. a. avium* et 13 à *M. a. hominissuis*.² : sur 8 isolats, 3 correspondaient à *M. a. avium* et 5 à *M. a. hominissuis*.³ : les 2 isolats correspondaient à *M. a. hominissuis*.⁴ : dans cette étude, 43% des MNT correspondaient à des bactéries du complexe *avium-intracellulare* (MAC) ; seules 46 souches (parmi les 57% représentant les isolats autres que *M. avium*) ont fait l'objet d'une identification.⁵ : mycobactéries du complexe *M. terrae*.⁶ : mycobactéries non identifiées ou non rattachées à une espèce répertoriée.

Trois groupes émergent parmi les MNT isolées. C'est le cas des sous-espèces *avium* et *hominissuis* de *M. avium* (*Maa* et *Mah*), des mycobactéries du complexe *M. terrae*, et de *M. kansasii*. La plupart des mycobactéries n'ont fait l'objet que d'isolements ponctuels.

a- *Mycobacterium avium*

Maa et *Mah* sont des mycobactéries phénotypiquement très proches. Antérieurement différenciées sur la base d'une classification sérologique, elles le sont actuellement par des méthodes génotypiques¹². De nombreuses études (notamment les plus anciennes) se contentent de faire référence à l'espèce *M. avium* sans distinguer les sous-espèces *avium* et *hominissuis*. Cette espèce représente la majorité des MNT isolées.

- *M. avium* subsp. *avium*, pathogène pour les oiseaux, cause la tuberculose aviaire. La tuberculose des volailles étant devenue rare dans le contexte actuel de l'élevage avicole, c'est sans doute l'avifaune sauvage (relayée éventuellement par de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages susceptibles d'être infectées) qui en constitue le principal réservoir et disséminateur.

Comme l'ont démontré maintes études d'inoculations expérimentales, l'infection des bovins par cette bactérie n'est généralement suivie d'aucune lésion évolutive décelable à l'œil nu. Elle peut cependant occasionner une légère hyperplasie transitoire des nœuds lymphatiques, en particulier ceux qui drainent le tube digestif (Lucas et Gayot, 1967) et, sur un petit nombre d'animaux, des lésions « tuberculeuses » sur ces nœuds lymphatiques (Dvorska *et al.*, 2004). D'autres localisations telles que des atteintes d'organe (mammites, métrite, atteinte testiculaire, pneumonie...), voire exceptionnellement des infections systémiques, sont ponctuellement décrites (Thoen *et al.*, 1981 ; Thorel *et al.*, 2001 ; Dvorska *et al.*, 2004).

L'infection des bovins est associée au développement d'une hypersensibilité retardée spécifique détectable avec la tuberculine aviaire et, de façon variable, avec la tuberculine bovine. Une étude d'infection expérimentale de 65 bovins (voie SC, taille de l'inoculum non mentionnée) a montré, au bout de 3 semaines, que tous étaient positifs au contrôle avec la tuberculine aviaire, alors que seulement 7 (10,8%) étaient positifs et 19 (29,2%) douteux à la tuberculine bovine (Kokouritchev, 1965).

Hormis quelques cas particuliers, l'état d'infection par ces bactéries est décrit comme transitoire et leur élimination est suivie d'une disparition de la réactivité cutanée aux tuberculines bovine et aviaire. Ce délai est cependant difficile à apprécier, car sans doute variable d'un animal à l'autre, et dépendant de la virulence propre de la souche infectante, la dose infectante et la répétition des doses. Une étude de Hope *et al.* (2005) montre que 3 veaux sur 5, testés 16 semaines après inoculation ($1,6 \cdot 10^6$ UFC par voie SC), présentent encore des épaissements de 3 à 5 mm (épaissement moyen, pour les 5 veaux, de 3 mm) au point d'injection de la tuberculine PPD_b, l'IDC s'avérant néanmoins négative du fait de la réaction spécifique plus importante (épaissement moyen de 8 mm) au lieu d'injection de la tuberculine PPD_a (Hope *et al.*, 2005). La réactivité aux tuberculines bovine et aviaire sur le terrain pourrait persister jusqu'à 6 à 12 mois (Lucas et Gayot, 1967).

- *M. avium* subsp. *hominissuis* est une bactérie strictement environnementale (eau, sol, poussières, paille, sciure...), non (ou peu) pathogène pour les oiseaux. Elle est cependant un pathogène opportuniste pour les mammifères, notamment pour le porc chez qui elle est responsable de la majorité des lésions tuberculoïdes découvertes en abattoir (Matlova *et al.*, 2005 ; Avis 2009-SA-0022 de l'Afssa).

Cette bactérie est, comme *Maa*, couramment isolée chez des bovins (Dvorska *et al.*, 2004 ; Möbius *et al.*, 2006 ; Radomski *et al.*, 2010 ; Boschioli, 2013), mais, à la différence de *Maa*, moins fréquemment dans des lésions décelables (Dvorska *et al.*, 2004 ; Boschioli, 2013). La fréquence de son isolement lors d'abattage diagnostique de bovins

¹² Les sérotypes 1 à 3 du complexe MAC sont génétiquement identifiés comme *Maa* (IS901+ et IS1245+), les sérotypes 4 à 6, 8 à 11, et 21 comme *Mah* (IS901- et IS1245) et les sérotypes 7, 12 à 20, et 22 à 28 comme *M. intracellulare* (IS901- et IS1245+).

non négatifs témoigne de son importance comme cause de réactions aspécifiques à la tuberculine bovine. Malgré l'absence d'étude d'inoculation expérimentale, mais du fait de leur proximité génétique et antigénique, on peut considérer que l'intensité et la persistance des réactions induites se rapprochent de celles occasionnées par *Maa*.

b- Mycobactéries du complexe *Mycobacterium terrae*

Les mycobactéries du complexe *M. terrae*¹³, en particulier *M. nonchromogenicum*, sont des bactéries ubiquistes isolées dans le sol et l'environnement aquatique. *M. nonchromogenicum* est isolée chez des bovins présentant un test cutané positif ou négatif, habituellement en l'absence de lésion (Hughes *et al.*, 1993 et 2005 ; Mc Corry *et al.*, 2004). Elle a été, en outre, isolée du mucus nasal de six vaches provenant d'un cheptel tuberculeux mais présentant un test cutané négatif (Mc Corry *et al.*, 2004). *M. nonchromogenicum* représente le premier groupe bactérien isolé dans l'étude de Hughes *et al.* (2005) en Irlande du Nord, et le deuxième après *M. avium* en France (Boschioli, 2013). La fréquence relative de l'intervention de cette bactérie en France est cependant surévaluée, car elle est souvent isolée sur plusieurs animaux des troupeaux testés : ainsi, sur la période 2001-2010, la proportion de 30% par rapport aux animaux tombe à 17,7% (20 sur 113) si une seule souche est comptabilisée par troupeau (Bret, 2011).

c- *Mycobacterium kansasii*

M. kansasii est une espèce à croissance lente du groupe I de Runyon, au sein de laquelle sont différenciés 5 sous-types/génotypes. Elle héberge, comme *M. bovis*, les gènes codant les protéines ESAT-6 and CFP-10. Elle est isolée en particulier d'échantillons d'eau dans le milieu naturel, mais aussi dans la terre et l'humus (Thorel *et al.*, 2004). Cette mycobactérie opportuniste est l'une des MNT le plus souvent incriminée en pathologie humaine. Elle est associée occasionnellement, chez les bovins à des lésions des nœuds lymphatiques et du tractus respiratoire (Waters *et al.*, 2006 et 2010) et elle est isolée à partir de tissus provenant de bovins ayant présenté un test cutané positif. Elle représente 48% des isolats autres que MAC caractérisés en Grande-Bretagne dans l'étude de Vordermeier *et al.* (2007), mais seulement 2,1% en France (Boschioli, 2013). Les souches isolées appartenaient aux sous-types 1 (le plus fréquemment isolé chez l'Homme) ou 2 en Grande-Bretagne, et seulement au sous-type 2 en France. Un essai d'inoculation chez 4 veaux de 3 mois (souche de sérotype 1, instillée au niveau des amygdales à la dose de 4×10^8 UFC) a montré une réponse immune aux antigènes ESAT-6 et CFP-10 toujours détectable au bout de 4 mois en dépit de l'absence de lésion (Waters *et al.*, 2006). Une réaction faiblement positive était également détectable avec la tuberculine PPD_b, mais l'IDC était négative.

- Autres mycobactéries

Les autres mycobactéries n'ont fait l'objet que d'isolements ponctuels, ce qui ne permet pas d'éliminer leur rôle dans les réactions observées. Certaines, d'ailleurs, sont connues comme des mycobactéries opportunistes incriminées parfois dans des épisodes cliniques associés au développement de réactions non négatives en IDS et, parfois, en IDC.

M. gordonae (Oudar *et al.*, 1968), *M. vaccae* (Shimizu *et al.*, 1978), *M. terrae* (Thorel *et al.*, 1990) et *M. fortuitum* ont été incriminées dans l'étiologie de la thélite nodulaire tuberculoïde (Joubert *et al.*, 1963). La dermite nodulaire tuberculoïde ou « skin tuberculosis » (Lucas et Gayot, 1967), était aussi décrite autrefois, mais la mycobactérie

¹³ Le complexe *M. terrae* (ou clade *M. nonchromogenicum/terrae*) réunit plusieurs espèces non pigmentées à croissance lente (groupe III selon la classification de Runyon) telles que *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. hiberniae*, *M. triviale* et *M. arupense*. Ce complexe est considéré comme non pathogène, même si des cas d'infection humaine ont été occasionnellement rapportés.

n'a pas été identifiée. Ces deux mycobactérioses cutanées chroniques étaient associées à une sensibilisation cutanée aux tuberculines bovine et aviaire persistante (2,2 ans en moyenne pour la dermite nodulaire tuberculoïde). Fréquemment décrites autrefois, ces maladies semblent actuellement rares (quelques cas de thélite nodulaire signalés dans l'est de la France) et n'ont pas fait l'objet de publication depuis plus de 20 années.

Les autres mycobactéries citées ci-dessous sont essentiellement la cause d'une réactivité faible et transitoire aux tuberculines bovine et aviaire.

M. fortuitum, qui fut parfois incriminée comme une cause de mammite (Peterson, 1965), est citée comme une cause fréquente d'interférence dans le dépistage de la tuberculose bovine en Afrique du Sud (Michel, 2008).

M. chelonae (Ménard *et al.*, 1983) et *M. phlei* (Walravens *et al.*, 2002) sont aussi des exemples de mycobactéries environnementales éventuellement isolées chez des bovins réagissant à la tuberculine, impliquées parfois dans des cas de mammite.

M. intracellulare, bactérie du complexe *M. avium*, est aussi connue pour infecter transitoirement les bovins (Thorel *et al.*, 2001). Inoculée expérimentalement par voie SC, elle provoque une lésion locale granulomateuse associée à une réactivité transitoire aux tuberculines bovine et aviaire (Corner et Pearson, 1978).

Enfin, *M. szulgai* et *M. flavescens*, sont des bactéries environnementales qui partagent avec *M. kansasii* et *M. gordonae* (principale mycobactérie incriminée dans la thélite nodulaire tuberculoïde) la particularité de posséder les gènes codant les protéines ESAT-6 et CFP-10, donc potentiellement responsables de réactions croisées, non seulement lors d'intradermo-tuberculation, mais aussi lors de tests IFN γ ESAT-6/CFP-10.

L'existence d'antigènes communs entre mycobactéries non tuberculeuses (MNT) et tuberculeuses est depuis longtemps décrite comme responsable de réactions non spécifiques lors du dépistage de la tuberculose bovine, à l'origine d'erreurs par excès. Elle avait justifié la reconnaissance, en 1963, de l'IDC comme méthode officielle de dépistage en complément de l'IDS.

M. avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*), agent de la paratuberculose est l'une des principales causes connues de réactions non spécifiques. C'est le cas aussi de nombreuses mycobactéries non tuberculeuses (MNT) naturellement présentes dans l'environnement (eau, terre...) qui peuvent infecter les bovins, comme le montrent, par exemple, les résultats des analyses réalisées par le laboratoire national de référence de l'Anses-Maisons-Alfort à partir de prélèvements issus de bovins « non négatifs » aux tests de dépistage. Bien que biaisées (elles sont spécifiquement orientées sur l'isolement de *M. bovis* dans le but de confirmer ou infirmer des suspicions de tuberculose bovine), ces analyses ont permis de caractériser plus de quarante espèces de MNT, les plus nombreuses correspondant à des mycobactéries des complexes *M. avium* (en particulier *M. avium hominissuis*) et *M. terrae* (en particulier *M. nonchromogenicum*). La constatation que plusieurs MNT d'espèces différentes peuvent coexister dans un même cheptel, y compris dans des cheptels reconnus tuberculeux, complique néanmoins l'interprétation des résultats obtenus.

L'infection par ces mycobactéries (en dehors de *Map*) régresse en général spontanément en quelques semaines. En cours d'infection, une majorité des animaux infectés ne sont détectables qu'avec la tuberculine aviaire, mais quelques-uns peuvent présenter, transitoirement (quelques semaines à quelques mois), une réaction douteuse ou positive

(difficile à interpréter) à la tuberculine bovine. On ignore cependant l'impact d'infections répétées dans le temps sur l'évolution de ces réactions.

Plus rarement, certaines infections par des MNT (comme c'est le cas avec la paratuberculose) peuvent devenir chroniques et s'accompagner d'une sensibilisation durable (plusieurs années dans le cas de la dermite nodulaire tuberculoïde).

L'hypothèse d'une sensibilisation des bovins par *M. microti*, mycobactérie du complexe *M. tuberculosis* infectant naturellement différentes espèces de la faune sauvage (rongeurs, sangliers, blaireaux) a été suggérée, mais le fait que l'infection par cette bactérie puisse ou non interférer dans le dépistage de la tuberculose bovine en France n'est pas documenté à ce jour.

3-1-2 Sensibilisation par d'autres bactéries.

Les bactéries incriminées appartiennent essentiellement à certains genres voisins de l'ordre des Actinomycetales (défini notamment par la présence d'acides mycoliques dans la paroi expliquant une acido-alcool-résistance partielle), parfois associées chez les bovins à des lésions pyogranulomateuses des nœuds lymphatiques ou isolées chez des bovins ayant réagi positivement à l'intradermo-tuberculation. C'est le cas notamment d'*Actinomyces spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Gordonia spp.*, *Nocardia spp.*, *Rhodococcus spp.* et *Trueperella spp.* Ces bactéries peuvent, en effet, présenter des antigènes communs avec certaines mycobactéries, y compris celles du complexe tuberculeux.

La mise en cause de telles bactéries (*Actinomyces bovis*, *Nocardia asteroides*...) était assez courante par le passé, à la suite de leur découverte chez des bovins abattus après avoir présenté des réactions tuberculiniques positives, sans que soient détectées les lésions habituelles de tuberculose ou isolées des mycobactéries. Certains auteurs, comme Lucas et Gayot (1967) émettaient cependant l'hypothèse d'une liaison apparente fortuite entre ces observations et les réactions positives en l'absence de faits expérimentaux attestant leur existence. Diverses études soulignent, par ailleurs, la présence conjointe, dans des lésions évoquant la tuberculose, de l'une de ces bactéries et d'une MNT, et montrent que, selon la technique utilisée, l'une ou l'autre des bactéries peut être isolée (Müller *et al.*, 2011). Cela souligne l'éventualité de confusions possibles ayant permis d'incriminer des bactéries autres que des MNT comme à l'origine d'une sensibilisation non spécifique à la tuberculine.

Enfin, les méthodes de décontamination employées pour la recherche des mycobactéries dans les tissus prélevés à l'abattoir ne permettent pas, sinon à titre exceptionnel (exemple de *Gordonia spp.*, ponctuellement isolée chez quelques bovins en France), l'isolement d'autres espèces bactériennes (Boschioli, 2013), rendant impossible de déceler une éventuelle association apparente entre l'infection de bovins par l'une de ces espèces bactériennes et des réactions non négatives en IDS.

Des articles anciens évoquent l'échec de différents essais destinés à sensibiliser des bovins à la tuberculine bovine en les inoculant avec des bactéries telles que *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Trueperella pyogenes* ou *Actinomyces bovis*. Des essais destinés à déterminer la sensibilité et la spécificité d'un test cutané pour le diagnostic des infections mammaires causées par *Nocardia asteroides* n'ont pas permis, non plus, de révéler des réactions croisées entre des antigènes extracellulaires de cette bactérie et de ceux de *M. fortuitum* ou la tuberculine (Salman *et al.*, 1982).

Peu d'études récentes sont cependant disponibles, et leur rareté ne permet pas de trancher sur l'éventualité d'une interférence de telles infections avec le dépistage de la tuberculose bovine. Des antigènes communs de groupe sont détectables chez des microorganismes des genres *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*, et une étude expérimentale a révélé que des lapins infectés par *Nocardia* et *Rhodococcus* montraient une réaction cutanée vis-à-vis de la tuberculine PPD et possédaient des anticorps

réagissant en fixation du complément et hémagglutination avec des antigènes mycobactériens (Nuratinov et Efendiev, 2001). Ces résultats divergent cependant avec les études précédemment évoquées. Des antigènes communs expliquent aussi des réactions croisées chez des chèvres infectées par *C. pseudotuberculosis* lors du diagnostic de la paratuberculose par ELISA (Manning *et al.*, 2007).

En fait, même si certaines de ces bactéries sont effectivement la cause de fausses réactions positives chez des bovins indemnes de tuberculose, aucune observation ou expérimentation n'en apporte réellement la démonstration chez cette espèce. On ne peut qu'en supposer l'éventualité, par analogie avec les observations faites dans des troupeaux ovins ou caprins, dans lesquelles la question de la réalité de l'interférence se pose de manière récurrente lorsqu'ils sont atteints de lymphadénite caséuse, maladie causée par *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Sharpe *et al.*, 2010). Des investigations réalisées dans un troupeau caprin indemne de tuberculose et très infecté par *C. pseudotuberculosis* ont ainsi permis d'observer une proportion de réagissants de 76% (38 sujets sur 50), en majorité parmi les animaux jeunes (moins de 24 mois). Les animaux étaient néanmoins négatifs en IDC compte tenu des réactions plus importantes à la tuberculine aviaire qu'à la tuberculine bovine (Bezoz *et al.*, 2012).

Des antigènes voisins pourraient expliquer la possibilité d'interférences lors d'infection des bovins par certaines Actinomycetales (*Actinomyces spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Gordonia spp.*, *Nocardia spp.*, *Rhodococcus spp.* ou *Trueperella spp.*). Ce type d'interférence a surtout été évoqué (bien que non confirmé par des études d'inoculations expérimentales) dans des troupeaux de petits ruminants infectés par *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Il n'existe pas d'observations équivalentes chez les bovins, ni d'étude expérimentale attestant un quelconque rôle de l'une de ces bactéries comme source d'interférence qui mérite d'être prise en compte sur le terrain.

En outre, les analyses bactériologiques effectuées dans le cadre de la prophylaxie de la tuberculose bovine, orientées spécifiquement sur la recherche de *M. bovis*, ne sont pas adaptées à l'isolement de ces bactéries, rendant impossible de déceler une éventuelle association avec des réactions non négatives en intradermo-tuberculation simple.

3-2 Baisse de la sensibilité (erreurs par défaut)

Une baisse de la sensibilité des tests tuberculiques (et/ou IFN γ) chez les bovins n'est documentée que dans le cas d'infections mixtes par *Maa* et *M. bovis* (Amadori *et al.*, 2002 ; Hope *et al.*, 2005), d'une part, et *Map* et *M. bovis* (Aranaz *et al.*, 2006 ; Alvarez *et al.*, 2008), d'autre part.

Les études relatives aux effets d'une co-infection par *Maa* et *M. bovis* sont expérimentales et ont été entreprises pour vérifier les conséquences d'une pré-exposition des animaux à *Maa* sur le dépistage de la tuberculose. Des essais de vaccination de veaux avec du BCG avaient montré qu'une infection préalable par *Maa* induisait une réponse anamnétique à l'égard des antigènes (communs aux deux bactéries) présents dans la tuberculine aviaire (Howard *et al.*, 2002). Parallèlement, il avait été montré chez quelques veaux inoculés successivement par *Maa* et *M. bovis*, que la sensibilisation à *Maa* pouvait affecter la réponse obtenue vis-à-vis de *M. bovis* (Amadori *et al.*, 2002). Ces observations sont complétées par celles de Hope *et al.* (2005), lesquels montrent, en comparant respectivement des lots de veaux inoculés successivement par *Maa* ($1,6 \times 10^6$ UFC par voie SC) et *M. bovis* (1×10^4 UFC par voie intra nasale), ou seulement inoculés par *Maa* ou *M. bovis*, une réponse spécifique vis-à-vis de *M. bovis* plus faible chez les animaux antérieurement exposés à *Maa* que chez les animaux exposés seulement à *M. bovis* (Hope *et al.*, 2005). Dans cette expérimentation, l'IDC réalisée 16 semaines après

l'épreuve virulente s'avère positive chez les quatre veaux exposés seulement à *M. bovis*, mais sur un seul des quatre veaux co-infectés. La réponse aux tests IFN γ est également affectée chez ces animaux. En outre, bien qu'aucune différence significative ne soit observée en fonction des scores lésionnels dans les 2 groupes d'animaux, la quantité de bacilles tuberculeux est significativement plus faible dans les lésions tuberculeuses des sujets co-infectés. Les auteurs concluent que l'inoculation de *M. bovis* induit un effet rappel lié à la réponse T-cellulaire consécutive à l'infection antérieure par *Maa*. Cette réponse secondaire aurait pour effet de limiter la multiplication bacillaire, avec pour conséquence, d'une part, de limiter le développement des lésions tuberculeuses et d'autre part de limiter la réponse immune spécifique, affectant de ce fait la sensibilité des tests de dépistage de la tuberculose. Ces études restent néanmoins expérimentales, réalisées sur un faible nombre d'animaux et dans des conditions qui ne s'apparentent pas forcément aux conditions dans lesquelles se produisent les cas d'infection naturelle.

Les données relatives aux effets de la paratuberculose sur le dépistage de la tuberculose sont issues de constatations dans des cheptels naturellement infectés.

Diverses observations, dont celle d'Aranaz *et al.* (2006), montrent qu'une proportion variable de bovins tuberculeux dans un troupeau infecté de paratuberculose peut ne pas être détectée par IDC et/ou un test IFN γ . Ces résultats ont été confirmés par Alvarez *et al.* (2008) lors d'une étude réalisée dans un cheptel bovin co-infecté par ces deux bactéries, montrant une sensibilité apparente du test IFN γ (BovigamTM) estimée à 50% chez des animaux co-infectés contre 78,3% chez les animaux seulement tuberculeux. Dans cette étude, les animaux tuberculeux non détectés par le test IFN γ (8 animaux sur 16 co-infectés) ne l'étaient pas non plus par IDC. Des résultats du même type avaient été précédemment obtenus dans un troupeau caprin, également co-infecté, faisant ressortir une association négative entre les résultats au test IFN γ et au test ELISA paratuberculose (Alvarez *et al.*, 2007). Ces résultats méritent, néanmoins, d'être confirmés dans des études à plus grande échelle.

Ces deux groupes d'études soulignent en tout cas la nécessité d'une approche « troupeau » dans l'interprétation des tests de dépistage lorsqu'une infection mixte avec des bactéries susceptibles d'altérer la sensibilité des tests utilisés est suspectée.

Plusieurs observations suggèrent que l'infection tuberculeuse de bovins déjà infectés par des MNT, comme cela a été montré expérimentalement avec *Map* ou *Maa* et observé sur le terrain dans un troupeau infecté par *Map*, s'accompagne de la réduction de sensibilité des tests de détection de la tuberculose bovine, chez une partie des sujets co-infectés, donnant des erreurs par défaut. La réalité et l'importance de telles interférences méritent cependant d'être confirmées dans des études de terrain à plus grande échelle.

4. Causes iatrogènes interférant avec le dépistage de la tuberculose

Rappelons à ce titre que la réglementation française stipule que « *la vaccination et toute intervention thérapeutique ou toute administration de produit à effet sensibilisant ou désensibilisant à l'égard de la réaction à la tuberculine sont interdites. Si, sur un même animal, en même temps que la recherche de la tuberculose, d'autres interventions nécessitant l'administration de produits, quels qu'ils soient, doivent être pratiquées, ces interventions ne doivent être effectuées qu'après lecture de la réaction tuberculinique* »¹⁴.

¹⁴ 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 bovins et des caprins.

Conformément à la question posée, seules seront abordées des interventions portant sur le cheptel (et non pas celles effectuées ponctuellement, notamment dans le cadre de soins, sur quelques animaux) susceptibles d'interférer avec le dépistage de la tuberculose bovine.

Deux interventions en élevage sont susceptibles d'induire des interférences dans les cheptels concernés : l'immunostimulation mycobactérienne et la vaccination contre la paratuberculose.

4-1 Immunostimulation mycobactérienne

Les mycobactéries possèdent des propriétés immunostimulantes non spécifiques (activation de l'immunité innée, suivie d'une induction des cellules T-Th1) et certaines préparations ont été proposées pour améliorer la résistance du bétail vis-à-vis des infections virales.

Des préparations commerciales à base de suspension de *M. chelonae* vivante ou inactivée ont été proposées par le passé. De telles préparations se sont avérées susceptibles de sensibiliser à la tuberculine des animaux non infectés. Il a été aussi constaté que des administrations répétées pouvaient provoquer la désensibilisation d'animaux infectés par *M. bovis*, donc leur non détection par intradermo-tuberculination (Thorel, 1976).

Aucune préparation de cette nature ne dispose actuellement d'AMM en France.

4-2 Vaccination contre la paratuberculose

Une forte homologie entre les protéines immunodominantes communes entre *Map* et *M. bovis* explique le développement des réactions croisées observées lors d'intradermo-tuberculination sur des animaux infectés ou vaccinés. Des vaccins (Silirum®, Zoetis, indiqué pour les bovins, et Gudair®, CZ Veterinaria, indiqué chez les petits ruminants mais éventuellement prescriptible dans le cadre de la cascade chez les bovins) peuvent faire l'objet d'une demande d'autorisation d'importation, en provenance de certains pays de l'Union Européenne (des demandes ont déjà été faites pour le vaccin Gudair®). Leur emploi peut générer une interférence avec le dépistage de la tuberculose bovine.

L'impact de la vaccination sur le dépistage de la tuberculose dans les élevages bovins a été évalué dans l'avis 2012-SA-0198 en date du 06/02/2013 et ne sera pas développé dans cet avis.

5. Conclusions du Comité d'experts spécialisé Santé animale

L'intradermo-tuberculination simple (IDS) et l'intradermo-tuberculination comparative (IDC), préconisées par l'Union Européenne, sont les principaux tests utilisés pour le dépistage de la tuberculose bovine en France. Ils permettent d'évaluer l'intensité de la réaction d'hypersensibilité de type retardé spécifique à la tuberculine bovine (IDS) et aux tuberculines bovine et aviaire (IDC).

Des infections ou infestations variées peuvent générer, chez les bovins, des interférences se traduisant, lors des opérations de dépistage de la tuberculose, soit par des réactions positives ou douteuses chez des sujets indemnes de tuberculose (erreurs par excès), soit par des réactions négatives chez des sujets tuberculeux (erreurs par défaut). Seules les interférences envisageables sur le territoire français seront abordées en conclusion.

Les erreurs par excès sont documentées et plus fréquentes compte tenu de la faible prévalence de la maladie. Elles sont consécutives à l'infection (ou la vaccination) des bovins par des agents pathogènes ayant des antigènes communs avec *Mycobacterium bovis*, agent quasi-exclusif de la tuberculose bovine en France.

- *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, agent de la paratuberculose, et de nombreuses autres mycobactéries non tuberculeuses (notamment des mycobactéries des complexes *M. avium* et *M. terrae*) naturellement présentes dans l'environnement (eau, terre...), voire transportées par des trématodes (*Fasciola hepatica*), sont la cause principale de ces erreurs.

- Des infections par certaines Actinomycetales (*Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Gordonia* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. ou *Trueperella* spp.) sont parfois incriminées, mais leur implication éventuelle en tant que cause de réactions non négatives chez les bovins n'a jamais été démontrée expérimentalement.

- L'hypothèse d'une sensibilisation des bovins par *M. microti*, mycobactérie du complexe *M. tuberculosis* infectant naturellement la faune sauvage a été suggérée, mais aucune donnée ne permet actuellement d'en étayer la réalité en France.

Il demeure cependant difficile d'incriminer une cause prédominante pour expliquer les réactions aspécifiques actuellement observées en France. Les seules données disponibles sont les résultats des analyses bactériologiques effectuées dans le cadre de la prophylaxie de la tuberculose bovine. Or, le fait même que ces analyses soient spécifiquement orientées vers la recherche de *M. bovis* constitue un biais important rendant difficile l'interprétation des résultats obtenus. En outre plusieurs mycobactéries non tuberculeuses d'espèces différentes peuvent coexister dans un même cheptel, y compris dans des cheptels reconnus tuberculeux.

La proposition d'études complémentaires et de moyens de prévention adaptés sera plus spécifiquement traitée dans une saisine ultérieure.

Des erreurs par défaut sont aussi possibles. Elles s'expliquent par une modulation de la réponse immunitaire à *M. bovis* s'exprimant notamment par une diminution de la réponse aux tests de dépistage de la tuberculose bovine induite par des causes virales, bactériennes, et parasitaires (à l'occasion de co-infection ou de co-infection/infestation).

- Pour les virus, peu de données sont disponibles et les phénomènes susceptibles d'induire une baisse d'intensité de la réaction tuberculinique par modulation de la réaction immunitaire sont liés à des infections aiguës. Seul le pestivirus bovin (virus BVD-MD), compte tenu de sa prévalence en France et de son impact sur la réponse immunitaire, serait à prendre en considération. Toutefois, l'impact serait fugace car limité à la durée de l'infection transitoire et n'interfererait potentiellement que quelques jours avec les tests d'intradermo-tuberculation ou le dosage de l'interféron gamma (IFN γ). Compte tenu de l'absence ou de la rareté des infections dues aux virus de la leucose bovine, de l'immunodéficience bovine et du caractère transitoire d'une immunodépression induite par l'herpèsvirus bovin 1, l'impact de ces virus peut être considéré comme négligeable.

- Quelques études ponctuelles montrent que l'intensité de la réaction spécifique de *M. bovis* observée lors d'une intradermo-tuberculation peut être réduite à l'occasion d'une co-infection avec certaines mycobactéries non tuberculeuses (*M. avium* subsp. *avium* ou *M. avium* subsp. *paratuberculosis*). La réalité et l'importance de telles interférences méritent cependant d'être confirmées dans des études de terrain à plus grande échelle, avant d'être prises en considération.

- En ce qui concerne les parasites, l'analyse des articles publiés a permis d'envisager, dans le cas de co-infestation par *F. hepatica* en conditions expérimentales, une diminution de l'intensité des réponses aux tests de dépistage de la tuberculose (intradermo-tuberculation et IFN γ) sans toutefois aboutir systématiquement à une diminution de sensibilité de ces tests. Ces données expérimentales ne permettent pas, cependant, d'apprécier la persistance et l'amplitude des interférences dans le temps lors d'infestations chroniques par *F. hepatica*. Les données épidémiologiques indiquent

également une probable diminution de la sensibilité de l'intradermo-tuberculination lors de co-infestation par *F. hepatica*.

En plus de l'hypothèse de baisse de la sensibilité du dépistage de la tuberculose bovine en raison de la co-infestation par *F. hepatica*, les observations disponibles suggèrent l'hypothèse d'interactions complexes entre *F. hepatica* et *M. bovis* pouvant entraîner une modification de la sensibilité/réceptivité d'un animal à *F. hepatica* ou à *M. bovis* lorsqu'il est préalablement infecté par *M. bovis* ou infesté par *F. hepatica*. Ces deux hypothèses méritent en premier lieu d'être testées sur la base de nouvelles études expérimentales ou épidémiologiques. Si elles étaient confirmées, des études quantifiant l'impact des interactions entre *M. bovis* et *F. hepatica* sur le dépistage de la tuberculose à l'échelle d'un élevage ou d'une région devraient être mises en œuvre.

De même, des investigations permettant une quantification des réactions faussement positives et négatives et de leur étiologie seraient informatives.

Par ailleurs, des facteurs environnementaux peuvent jouer sur la prévalence des agents interférents et devront donc être pris en compte dans les études à venir. Ainsi, cette situation, dépendante du contexte, requiert une nouvelle approche prenant en compte la diversité des agents interférents (de type négatif ou positif) présents dans le milieu naturel, de leurs interrelations et des conséquences qu'ils peuvent avoir dans le dépistage de la tuberculose bovine.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du comité d'experts spécialisé « Santé Animale ».

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Tuberculose, dépistage, interférences, bovins, mycobactéries

BIBLIOGRAPHIE

Alvarez J, De Juan L, Bezos J, Romero B, Saez JL, Gordejo FJ, Briones V, Moreno MA, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A (2007). Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Veterinary Microbiology* ; 128: 72–80.

Alvarez J, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL, Marqués S, Domínguez C, Mínguez O, Fernández-Mardomingo B, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A (2008). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary Microbiology* ; 135: 389-393.

Alzieu JP, Bosquet G, Camuset Ph, Chauvin A, Dorchie Ph (2006). L'observatoire de la grande douve : premiers résultats hiver 2004/2005. *Journées Nationales GTV Nantes* ; 355-360.

Alzieu JP, Bosquet G, Camuset Ph, Chauvin A, Dorchie P (2007). L'observatoire de la grande douve. Résultats d'une enquête sur 520 bovins durant l'hiver 2007. *Journées Nationales GTV Nantes* ; 853-858.

Amadori M, Tagliabue S, Lauzi S, Finazzi G, Lombardi G, Telo P, Pacciarini L, Bonizzi L (2002). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* ; 49(2): 89-96.

Aranaz A, De Juan L, Bezos J, Alvarez J, Romero B, Lozano F, Paramio JL, López-Sánchez J, Mateos A, Domínguez L (2006). Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium subsp. paratuberculosis*. *Veterinary Research* ; 37: 593-606.

Archambault D, Béliveau C, Couture Y, Carman S (2000). Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Research* ; 31(2): 215-227.

Belloc C, Polack B, Schwartz-Cornil I, Brownlie J, Lévy D (1996). Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. *Veterinary Research* ; 27(4-5): 395-402.

Bezoz J, Álvarez J, Mínguez O, Marqués S, Martín O, Vigo V, Pieltain C, Romero B, Rodríguez S, Casal C, Mateos A, Domínguez L, de Juan L (2012). Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under different epidemiological situations. *Research in Veterinary Science* ; 93: 636-640.

Boschioli ML (2013). Mycobactéries d'origine bovine identifiées en France de 2000 à 2010 par le laboratoire de santé animale de l'ANSES-Maisons-Alfort. Communication personnelle.

Brackenbury LS, Carr BV, Charleston B (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Veterinary Microbiology* ; 96(4): 337-344.

Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP, Mills KHG (1999). *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* ; 67(10): 5372-5378.

Bret A (2011). Intérêt des différents tests de diagnostic biologique de la tuberculose bovine et identification de mycobactéries non tuberculeuses isolées chez des bovins en France. Thèse Vétérinaire. VetAgro Sup (Lyon).

Bryant NA, Davis-Poynter N, Vanderplassen A, Alcami A (2003). Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO Journal* ; 22: 833-846.

Campos M, Bielefeldt OH, Hutchings D, Rapin N, Babiuk LA (1989). Role of interferon gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells. *Cellular Immunology* ; 120: 259-269.

Charleston B, Hope JC, Carr BV, Howard CJ. (2001). Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Record* ; 149: 481-484.

Charleston B, Brackenbury LS, Carr BV, Fray MD, Hope JC, Howard CJ, Morrison WI, (2002). Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus *in vivo*. *Journal of Virology* ; 76(2): 923-7.

Chase CC (2013). The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals* ; 41(1): 52-60.

Chauvin A (2012). Trématodoses des ruminants. *Point Vétérinaire* ; numéro spécial « Parasitologie des ruminants », 62-67.

Claridge J, Diggle P, McCann CM, Mulcahy G, Flynn R, McNair J, Strain S, Welsh M, Baylis M, Williams DJL (2012). *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature Communications* ; 3: 853.

Clery D, Torgerson P, Mulcahy G (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary parasitology* ; 62(1): 71-82.

Coad M, Clifford D, Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO (2010). Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Veterinary research* ; 41(2): 14.

Cole ST (1999). Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Letter* ; 452: 7-10.

- Corner LA, Pearson CW (1978). Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. *Australian Veterinary Journal* ; 5458: 379-382.
- Courtenay O, Reilly LA, Sweeney FP, Hibberd V, Bryan S, Ul-Hassan A, Newman C, Macdonald DW, Delahay RJ, Wilson GJ, Wellington EM. (2006). Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biology Letters* ; 2: 460-462.
- Defra (2005). Rapport final sur projet de recherche. Pathogenesis and diagnosis of tuberculosis in cattle - complementary field studies. 48 pages.
- De la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* ; 81(2): 190-210.
- Druilhe P, Tall A, Soklam C (2005). Worms can worsen malaria : towards a new means to roll back malaria? *Trends in parasitology* ; 21(8): 359-361.
- Dvorska L, Matlova L, Bartos M, Parmova I, Bartl J, Svastova P, Bull TJ, Pavlik I (2004). Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Veterinary Microbiology* ; 99: 239-250.
- Eskra L, Splitter GA (1997). Bovine herpesvirus-1 infects activated CD4+ lymphocytes. *Journal of general Virology* ; 78: 2159–2166.
- Euzeby J (1971). Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine Tome II, Maladies dues aux Plathelminthes, Deuxième fascicule : Trématodes. Livre1 : Généralités, Distomatoses hépato-biliaires. Vigot Frères, Editeurs.
- Ezenwa VO, Jolles AE (2011). From host immunity to pathogen invasion: the effects of helminths coinfection on the dynamics of microparasites. *Integrative and Comparative Biology* ; 51(4): 540-551.
- Fediaevsky A, Perrin C (2011). Bilan de la surveillance et du contrôle de la leucose bovine enzootique en France en 2010 : rien de nouveau. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* ; 46: 15.
- Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, Yang L, Krause P, Margolis TP (2002). Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* ; 99: 978–983.
- Flaming K, van der Maaten M, Whetstone C, Carpenter S, Frank D, Roth J (1993). Effect of bovine immunodeficiency-like virus infection on immune function in experimentally infected cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* ; 36(2): 91-105.
- Flynn RJ, Mannion C, Golden O, Hacariz O, Mulcahy G (2007). Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* ; 75(3): 1373-1381.
- Flynn RJ, Mulcahy G, Welsh M, Cassidy JP, Corbett D, Milligan C, Andersen P, Strain S, McNair J (2009). Co-Infection of cattle with *Fasciola hepatica* and *Mycobacterium bovis* - Immunological consequences. *Transboundary and Emerging Diseases* ; 56(6-7): 269-274.

Foucras G (2008). Immunité anti-virale. *Bulletin des GTV*, Hors-série ; 133-140.

Fourichon C, Viet AF, Beaudeau F, Seegers H (2003). Stratégies de maîtrise de la diarrhée virale bovine (BVD) - Enjeux, situation européenne et méthodes d'évaluation des programmes de maîtrise. *Rencontre Recherches Ruminants* ; 269-276.

Frey HR, Flebbe U, Liess B, (1996). Prävalenz und klinische Symptomatik persistenter BVDvirusinfektionen in Rinderbeständen Niedersachsens. *Der praktische Tierarzt* ; 77: 49-52.

Gache K, Rautureau S, Mémeteau S, Mézi F (2012). *Bulletin épidémiologique santé animale* ; 54: 26-28.

Gershwin LJ (2012). Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* ; 35: 253–257.

González ET, Licursi M, Vila Roza E, Bonzo E, Mortola E, Frossard JP, Venables C (2008). Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: serological survey in Argentina. *Research in Veterinary Science* ; 85: 353–358

Goret P, Toma B (1967). Vers l'éradication de la tuberculose bovine. *Recueil de Médecine Vétérinaire* ; 143: 619-636.

Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Veterinary Microbiology* ; 112(2): 171-179.

Henderson G, Zhang Y, Jones C (2005). The bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cell protein 0 (bICP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. *Journal of General Virology* ; 86: 2697–2702.

Hope JC, Thom ML, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, Hewinson RG, Howard CJ (2005). Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clinical and Experimental Immunology* ; 141(3): 432-439.

Horzinek MC, Keldermans L, Stuurman T, Herrewegh A, Sillekens P, Koolen MJ (1991). Bovine immunodeficiency virus: immunochemical characterization and serological survey. *Journal of General Virology* ; 72: 2923-2928.

Houlihan MG, Dixon FW, Page NA (2008). Outbreak of bovine tuberculosis featuring anergy to the skin test, udder lesions and milkborne disease in young calves. *Veterinary Record* ; 163(12): 357-61.

Howard CJ, Kwong LS, Villarreal-Ramos B, Sopp P, Hope JC (2002). Exposure to *Mycobacterium avium* primes the immune system of calves for vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. *Clinical and Experimental Immunology* ; 130(2): 190-195.

Hughes MS, Skuce RA, Beck LA, Neill SD (1993). Identification of *Mycobacteria* from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* ; 31: 3216-3222.

Hughes MS, Ball NW, McCarroll J, Erskine M, Taylor MJ, Pollock JM, Skuce RA, Neill SD (2005). Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. *Veterinary Microbiology* ; 108: 101-112.

International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012.

<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>, consulté le 21 mai 2013.

Jahans K, Palmer S, Inwald J, Brown J, Abayakoon S (2004). Isolation of *Mycobacterium microti* from a male Charolais-Hereford cross. *Veterinary Record* ; 155(12): 373-374.

Joubert L, Oudar J, Ferney J, Van Haverbeke G (1963). Thélite nodulaire tuberculoïde de la vache laitière à mycobactéries atypiques scrotochromogènes. *Revue de Médecine Vétérinaire* ; 114(2): 87-105.

Kankya C, Muwonge A, Djønne B, Munyeme M, Opuda-Asibo J, Skjerve E, Oloya J, Edvardsen V, Johansen TB (2011). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: public health significance. *BMC Public Health* ; 11(1): 320-328.

Kokouritchev PI (1965). Le diagnostic allergique et anatomopathologique de la tuberculose aviaire chez les bovins. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics) ; 63: 1471-1482.

Koppers-Lalic D, Reits EAJ, Rensing ME, Lipinska AD, Abele R, Koch J, Rezende MM, Admiraal P, van Leeuwen D, Bienkowska-Szewczyk K, Mettenleiter TC, Rijsewijk FAM, Tampe R, Neefjes J, Wiertz EJHJ (2005). Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* ; 102: 5144–5149.

Lesslie LW (1959). Colloque International sur les Mycobactéries, Anvers 1959. Cité in Lucas, Gayot G (1967).

Lindberg A, Groenendaal H, Alenius S, Emanuelson U (2001). Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Preventive Veterinary Medicine* ; 51(3): 199-214.

Liu T, Khanna KM, Carriere BN, Hendricks RL (2001). Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons. *Journal of Virology* ; 75: 11178–11184.

Lucas A, Gayot G (1967). Procédés actuels de dépistage de la tuberculose bovine. Les cahiers techniques du centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation (XIII, Pathologie de la production du lait), éd. Centre national de la recherche scientifique. 63 pages.

Manning EJB, Cushing HF, Hietala S, Wolf CB (2007). Goats impact of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on serologic surveillance for Johne's disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* ; 19(2): 187-190.

Martin SJ, O'Neill TP, Bilello JA, Eiseman JL (1991). Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves. *Immunology Letters* ; 27(2): 81–84.

- Matlova L, Dvorska L, Ayele WY, Bartos M, Amemori T, Pavlik I (2005). Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with Mycobacteria as a supplement. *Journal of Clinical Microbiology* ; 43: 1261–1268.
- McNab WB, Jacobs RM, Smith HE (1994). A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and associations between test results, production records and management practices. *Canadian Journal of Veterinary Research* ; 58(1): 36–41.
- McCorry TP, McCormick CM, Hughes MS, Pollock JM, Neill SD (2004). *Mycobacterium nonchromogenicum* in nasal mucus from cattle in a herd infected with bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* ; 99: 281-285.
- Mc Sorley HJ, Maizels RM (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical microbiology reviews* ; 25(4): 585-608.
- Meas S, Ruas FJ, Usui T, Teraoka Y, Mulenga A, Chang KS, Masuda A, Madruga CB, Okashi K, Onuma M (2002). Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *Japanese Journal of Veterinary Research* ; 50(1): 9-16.
- Ménard L, Vanasse C, Diaz C, Rivard G (1983). *Mycobacterium chelonae* mastitis in a Quebec dairy herd. *Canadian Veterinary Journal* ; 24: 305-307.
- Ménard A, Agoulon A, L'Hostis ML, Rondelaud D, Collard S, Chauvin A (2001). *Myocastor coypus* as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France. *Veterinary Research* ; 32 (5): 499-508.
- Michel AL (2008). *Mycobacterium fortuitum* infection interference with *Mycobacterium bovis* diagnostics: natural infection cases and a pilot experimental infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* ; 20(4): 501-503.
- Möbius A, Lentzsch P, Moser I, Naumann L, Martin G, Köhler H (2006). Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Veterinary Microbiology* ; 117: 284–291
- Monies RJ, Head JC (1999). Bovine tuberculosis in housed calves. *Veterinary Record* ; 145(25): 743.
- Mulcahy G, O'Neill S, Fanning J, McCarthy E, Sekiya M (2005). Tissue migration by parasitic helminths – an immunoevasive strategy? *Trends in Parasitology* ; 21(6): 273-277.
- Müller B, de Klerk-Lorist LM, Henton MM, Lane E, Parsons S, Gey van Pittius NC, Kotze A, van Helden PD, Tanner M (2011). Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. *Veterinary Microbiology* ; 147: 340-5.
- Muluneh A (1994). Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV); Antibodies in the cattle population in Germany. Series B. *Journal of Veterinary Medicine* ; 41(1-10): 679-684.

- Nettleton PF, Entrican G (1995). Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal* ; 151(6): 615.
- Nuratinov RA, Efendiev IV (2001). Causes of para-allergy to tuberculin. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii* ; 1: 50-53. (Article en Russe. Résumé en anglais).
- Onet J, Constantinescu V, Sandu G (1978). Isolement de quelques souches de mycobactéries à partir de douves récoltées chez des bovins à l'abattoir. *Revue de Médecine Vétérinaire* ; 129(6): 933-937.
- Onuma M, Koomoto E, Furuyama H, Yasutomi Y, Taniyama H, Iwai H, Kawakami Y (1992). Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* ; 5(10): 1009–1015.
- Oudar J, Joubert L, Valette L (1968). Répercussion de la thélite nodulaire mycobactérienne sur le dépistage allergique de la tuberculose bovine. *Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon* ; 70: 121-126.
- Peterson KJ (1965). *Mycobacterium fortuitum* as a cause of bovine mastitis: tuberculin sensitivity following experimental infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association* ; 147(12): 1600-1607.
- Polack B, Schwartz I, Berthelemy M, Belloc C, Manet G, Vuillaume A, Levy D (1996). Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France. *Veterinary Microbiology* ; 48(1): 165-173.
- Potgieter LN (1995). Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* ; 11(3): 501-520.
- Radomski N, Thibault VC, Karoui C, de Cruz K, Cochard T, Gutiérrez C, Supply P, Biet F, Boschioli ML (2010). Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* ; 48: 1026–1034.
- Rautureau S, Perrin C (2012). Bilan de la surveillance et du contrôle de la leucose bovine enzootique en France. *Bulletin épidémiologique santé animale – alimentation* ; 54: 19-20.
- Rola-Łuszczak M, Kozaczyńska B, Kuźmak J (2011). Serological survey for bovine immunodeficiency virus in dairy cattle from Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences* ; 14: 579–583.
- Roussel AJ, Fosgate GT, Manning EJ, Collins MT (2007). Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* ; 230(6): 890-895.
- Saira K, Zhou Y, Jones C (2007). The infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 (bICP0) induces degradation of interferon response factor 3 (IRF3), and consequently inhibits beta interferon promoter activity. *Journal of Virology* ; 81: 3077–3086.

- Salman MD, Bushnell RB, Pier AC (1982). Determination of sensitivity and specificity of the *Nocardia asteroides* skin test for detection of bovine mammary infections caused by *Nocardia asteroides* and *Nocardia caviae*. *American Journal of Veterinary Research* ; 43: 332-335.
- Saurat P (1975). Réactions tuberculiques non spécifiques chez les bovins. L'intradermo-tuberculation comparative. *Informations techniques des services vétérinaires* ; 49-50: 39-46.
- Schreiber P, Dubois F, Drèze F, Lacroix N, Limbourg B, Coppe P (1999). Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection in Belgian white blue cattle in southern Belgium. *Veterinary quarterly* ; 21(1): 28-32.
- Sharpe AE, Brady CP, Johnson A, Byrne W, Kenny K, Costello E (2010). Concurrent outbreak of tuberculosis and caseous lymphadenitis in a goat herd. *Veterinary Record* ; 166: 591-592.
- Shimizu K, Hirose T, Sato M, Tsukamura M (1978). Isolation of acid-fast organisms resembling *Mycobacterium vaccae* from a lesion of bovine nodular thelitis. *Microbiology and immunology* ; 21(8): 469-472.
- Smith NH, Crawshaw T, Parry J, Birtles RJ (2009). *Mycobacterium microti*: more diverse than previously thought. *Journal of clinical microbiology* ; 47: 2551-2559.
- Snider TG, Hoyt PG, Jenny BF, Coats KS, Luther DG, Storts RW, Battles JK, Gonda MA (1997). Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* ; 13(1): 151-176.
- Snider TG, Hoyt PG, Coats KS, Graves KF, Cooper CR, Storts RW, Luther DG, Jenny BF, (2003). Natural bovine lentiviral type 1 infection in Holstein dairy cattle. I. Clinical, serological, and pathological observations. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* ; 26(2): 89-101.
- Steenhard NR, Jungersen G, Kokotovic B, Beshah E, Dawson HD, Urban Jr JF, Roepstorff A, Thamsborg SM (2009). *Ascaris suum* infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. *Vaccine* ; 27(37): 5161-5169.
- Stewart GR, Boussinesq M, Coulson T, Elson L, Nutman T, Bradley JE (1999). Onchocerciasis modulates the immune response to mycobacterial antigens. *Clinical and experimental immunology* ; 117(3): 517-523.
- Tohen CO, Karlson AG, Himes EM (1981). Mycobacterial infections in animals *Review of Infectious Diseases* ; 3(5): 960-972.
- Tohen CO, Waite KJ (1990). Some immune responses in cattle exposed to *Mycobacterium paratuberculosis* after injection with modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* ; 2(3): 176-9.
- Thorel MF (1976). Tuberculose à bacille bovin chez des vaches laitières traitées par *Mycobacterium chelonae* et anergiques à la tuberculine bovine. *Bulletin De l'Académie Vétérinaire de France* ; 49: 151-156.

Thorel MF, Morand M, Fontaine JJ, Gourreau JM (1990). Bovine nodular thelitis : a clinicopathological study of 20 cases. *Dermatology Veterinary* ; 1: 165-170.

Thorel MF, Huchzermeyer HF, Michel AL (2001). *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* ; 20(1): 204-218.

Thorel MF, Falkinham JO, Moreau RG (2004). Environmental mycobacteria from alpine and subalpine habitats. *FEMS microbiology ecology* ; 49(3): 343-347.

Usui T, Meas S, Konnai S, Ohashi K, Onuma M (2003). Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in dairy and beef cattle in hokkaido. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science* ; 65(2): 287-289.

Vordermeier HM, Brown J, Cockle PJ, Franken WP, Drijfhout JW, Arend SM, Ottenhoff TH, Jahans K, Hewinson RG (2007). Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clinical and Vaccine Immunology* ; 14(9): 1203-1209.

Walravens K, Marché S, Rosseels V, Wellemans V, Boelaert F, Huygen K, Godfroid J (2002). IFN-gamma diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Veterinary immunology and immunopathology* ; 87(3): 401-406.

Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Payeur JB, Harris NB, Minion FC, Greenwald R, Esfandiari J, Andersen P, McNair J, Pollock JM, Lyashchenko KP (2006). Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine Immunology* ; 13: 611-619.

Waters WR, Whelan AO, Lyashchenko KP, Greenwald R, Palmer MV, Harris BN, Hewinson RG, Vordermeier HM (2010). Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine Immunology* ; 17: 247-252.

Weller R, Skrypnik A, Zavgorodny A, Stegny B, Gerilovych A, Kutsan O, Pozmogova S, Sapko S (2009). The bovine tuberculosis burden in cattle herds in zones with low dose radiation pollution in Ukraine. *Veterinaria Italiana* ; 45: 225-233.

Welsh MD, Adair BM, Foster JC (1995). Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Veterinary immunology and immunopathology* ; 46(3): 195-210.

Winkler MT, Doster A, Jones C (1999). Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *Journal of Virology* ; 73: 8657-8668.

Yilmaz Z, Yesilbag K (2008). Clinical and Haematological Findings in Bovine Immunodeficiency. Virus (BIV) Infected Cattle. *Turkish journal of veterinary and animal sciences* ; 32(3): 207-214.

Zhang SC, Wood C, Xue WZ, Krukenberg SM, Chen QM, Minocha HC (1997). Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* ; 4(2): 232-235.

<http://agriculture.gouv.fr/la-rhinotracheite-infectieuse>, page consultée le 3 février 2013.