

# Les méthodes de dépistage et diagnostic de la Tb

Le dépistage d'une maladie « consiste en la recherche systématique, à l'aide d'examens », dans un élevage, des animaux « atteints par un trouble de santé donné, passé jusque là inaperçu ».

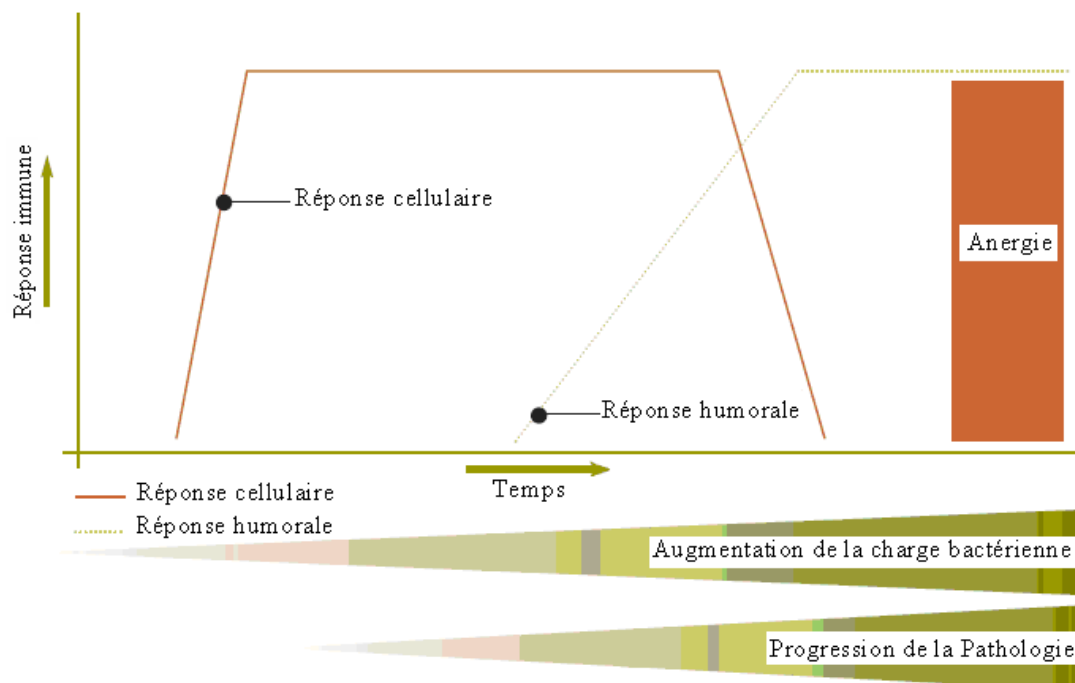
Le diagnostic « lui, correspond à l'identification de la maladie chez un animal qui présente des troubles » (Toma B. *et al.*, 2001).

## III.1. Les méthodes conventionnelles de dépistage et diagnostic de la Tb

III.1.1. Présentation des méthodes *ante mortem*: les tests tuberculiques

Les tests tuberculiques ou épreuves d'intradermotuberculation (IDT) sont basés sur la mise en évidence *in vivo* d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR), suite à l'injection intradermique de tuberculines (protéines extraites de surnageant de cultures mycobactériennes et purifiées) chez un animal infecté par le bacille tuberculeux (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

En effet, un bovin infecté développe une réaction immunitaire à médiation cellulaire (macrophages et lymphocytes T en particulier). Trois à six semaines en moyenne après l'infection, l'HSR devient décelable par IDT (*période allergique*). Cette réaction spécifique est tardive, progressive et durable.



**Figure I.1.4.** Représentation graphique du spectre des réponses immunes de bovins au cours de l'infection à *M. bovis*.

Une réponse immunitaire à médiation cellulaire (*Réponse cellulaire*) se développe initialement alors que la réponse immunitaire à médiation humorale (*Réponse humorale* (par anticorps)) se déclenche plus tardivement, c'est-à-dire lorsque la densité bacillaire augmente et que la maladie progresse (*progression pathologique*). Enfin, une période d'anergie (*Anergie*) survient lorsque la tuberculose se généralise. Dans ce cas, la réponse cellulaire n'est plus détectée alors que celle à médiation humorale prédomine (Pollock J.M. *et al.*, 2001 ; Pollock J.M. et Neill D., 2002 et Vordermeier H.M. *et al.*, 2006b).

Néanmoins, lorsque la tuberculose est très avancée ou généralisée, la détection de l'infection par une méthode allergique n'est plus possible (*période d'anergie post-tuberculeuse*) (Figure I.1.4 ; Wood P.R. *et al.*, 1992 ; Pollock J.M. et Neill D., 2002 ; Bénet J.J., 2008 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006b).

Deux types d'IDT sont employés : l'intradermotuberculation simple (IDS) et l'intradermotuberculation comparative (IDC). Un délai d'attente de six à huit semaines entre deux IDT est impératif afin d'éviter, au second test, une baisse de la réactivité des animaux sensibilisés (Bénet J.J., 2008).

Par ailleurs, avant la réalisation de chaque IDT, il est nécessaire de vérifier l'absence de grosseur ou de lésion au site d'injection. De plus, une tonte du lieu d'élection est fortement recommandée afin qu'il soit plus facilement repérable (Thorel M.F., 2003).

### III.1.1.1. L'IDS

#### III.1.1.1.1. Principe de l'IDS

L'IDS est un test de dépistage de première intention. Il consiste à injecter dans l'épaisseur du derme de l'encolure (obligatoire en France) ou du pli sous-caudal, une dose de la tuberculine bovine (0,1 ml de dérivés protéiniques purifiés (PPD) bovins titré à 20 000 UCT/ml) et à apprécier la réaction obtenue au point d'injection après un délai de 72 h (Delafosse A., Goutard F. et Thébaud E., 2002).

Dans le cas d'une IDS pratiquée chez un bovin tuberculeux, une réaction inflammatoire provoquant une tuméfaction circulaire douloureuse et chaude (HSR), avec parfois un point de nécrose, apparaît progressivement de 24 à 72 h après l'injection puis, persiste plusieurs jours et s'estompe progressivement en une huitaine de jours (Bénet J.J., 2008). La réglementation européenne et française prévoit la possibilité d'interpréter en tenant compte de la présence de signes cliniques.

La lecture quantitative, recommandée, du test implique la mensuration de l'épaisseur du pli cutané à l'aide d'un cutimètre. Néanmoins, une lecture qualitative est généralement réalisée (visuel, palpation). Un éventail de lésions est également prévu par la réglementation européenne (annexe B de la version consolidée en janvier 2010 de la directive européenne 64/432/CEE). Toutefois, ceci est très rare depuis l'utilisation des PPD.

Si l'épaississement du pli de peau est supérieur à 2 mm, le résultat de l'IDS est alors considéré comme non-négatif – Le résultat est douteux pour un épaississement supérieur à

2 mm et inférieur à 4 mm ; Le résultat est positif pour un épaissement supérieur ou égal à 4 mm –.

A l'inverse, dans le cas d'une réaction cutanée faible (épaissement inférieur ou égal à 2 mm) ou en l'absence de réaction, le test est négatif (Thorel M.F., 2003 ; Bénét J.J., 2008 ; OIE, 2008a).

#### III.1.1.1.2. Avantages et inconvénients de l'IDS

L'IDS est facile à réaliser et moins coûteuse que les autres tests de dépistage. Elle est également inoffensive et non sensibilisante pour l'animal (voire même désensibilisante après plusieurs répétitions, d'après Coad M. *et al.*, 2010). La valeur médiane de la sensibilité individuelle de l'IDS est de 83,9 % sans tenir compte du site d'injection (valeurs variant de 63,2 % à 100 %, De la Rua-Domenech R. *et al.*, (2006a)). En effet, l'IDS réalisée à l'encolure est plus sensible mais moins spécifique que l'IDS pratiquée au pli sous-caudal (Monaghan M.L. *et al.*, 1994 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

De plus, comme ce test est utilisé à l'échelle du cheptel, il est très sensible (sensibilité proche de 1) car il suffit qu'un seul animal donne un résultat positif pour que le cheptel infecté soit détecté et considéré infecté (Bénét J.J., 2008).

Toutefois, la spécificité de l'IDS se dégrade lorsque l'on passe à l'échelle du cheptel puisque tous les animaux testés du cheptel doivent avoir un résultat négatif pour que celui-ci soit déclaré indemne. En effet, la spécificité individuelle de l'IDS ayant une valeur médiane de 96,8 % sans tenir compte du site d'injection (valeurs variant de 75,5 % à 99,0 %, De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a) est relativement bonne alors que sa spécificité cheptel chute.

Il existe de nombreuses causes d'erreur par excès (Monaghan M.L. *et al.*, 1994), c'est-à-dire de réaction allergique à l'IDS chez un animal non tuberculeux (faux positif) : en particulier, la réaction croisée avec d'autres mycobactéries (*M. avium*, Mycobactéries atypiques), mais aussi une lecture trop précoce ou une interprétation abusive d'une réaction négative (Chenal R., 1994 ; Lauzi S. *et al.*, 2000).

#### III.1.1.2. L'IDC

##### III.1.1.2.1. Principe de l'IDC

L'IDC consiste à injecter dans l'épaisseur du derme de l'encolure des tuberculines bovines (B) et aviaires (A) en deux points séparés de 12-15 cm et à apprécier, au bout de 72 h, les

réactions aux points d'injection (Delafosse A., Goutard F. et Thébaud E., 2002 ; OIE, 2008a). L'interprétation du test est basée sur l'expression de deux résultats : celui obtenu pour l'épaississement du pli de peau après injection de tuberculine B et celui obtenu par la différence entre les épaississements des plis après injection des tuberculines B et A (Tableau I.1.1), (Bénet J.J., 2008).

**Tableau I.1.1.** Grille de lecture de l'IDC (d'après Bénet J.J., 2008).

<b>Tuberculine bovine</b>	<b>Différence d'épaississements entre réactions aux tuberculines bovine (B) et aviaire (A)</b>	<b>RESULTAT : « REACTION »</b>
<b>Si B &gt; 2 mm</b>	B – A > 4 mm	Positive
	B – A [1 – 4 mm]	Douteuse
	B – A < 1 mm	Négative
<b>Si B ≤ 2mm</b>	Quel que soit le résultat de B - A	Négative

#### III.1.1.2.2. Avantages et inconvénients de l'IDC

L'IDC a une sensibilité plus faible (52,0 % à 100 %, avec une valeur médiane de 80,0 % (93,5 % en cas d'interprétation rigoureuse, tenant compte des réactions positives et douteuses)) mais une meilleure spécificité (78,8 % à 100 %, avec une valeur médiane de 99,5 %) que l'IDS (données De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a). En effet, l'IDC est utilisée pour différencier les animaux infectés par *M. bovis* de ceux sensibilisés à la tuberculine par une exposition à d'autres mycobactéries ou à un genre apparenté (OIE, 2008a).

Elle permet donc d'écarter le risque de réactions faussement positives dues à des infections par des mycobactéries autres que *M. bovis*.

Cependant, cette technique est matériellement plus coûteuse et également plus difficile à réaliser que l'IDS. De plus, le recours à l'abattage diagnostique et aux tests de laboratoire pour confirmer l'infection, en cas de résultat positif en IDC, entraîne des coûts supplémentaires.

#### III.1.2. Présentation des méthodes *post mortem* : Inspection sanitaire à l'abattoir, Histologie et Bactériologie

La recherche *post mortem* d'animaux tuberculeux est basée sur l'inspection de carcasses bovines pour la détection de lésions suspectes de Tb. Ensuite, les méthodes de diagnostic de laboratoire, telles que les examens histologiques et bactériologiques permettent de confirmer ou d'infirmer ces suspicions.

### III.1.2.1. L'inspection *post mortem*

Les lésions suspectes de Tb découvertes, sur un animal mort, sont localisées le plus souvent au niveau des nœuds lymphatiques bronchiques, trachéobronchiques, rétropharyngiens et médiastinaux. De plus, les poumons, le foie, la rate sont communément affectés (OIE, 2008a).

Les lésions pulmonaires sont presque toujours de type nodulaire (tubercule gris, miliaire ou caséux). Le granulome tuberculeux a habituellement une apparence jaunâtre et une consistance caséuse, caséo-calcaire, ou calcifiée, ou occasionnellement une apparence purulente (OIE, 2008a).

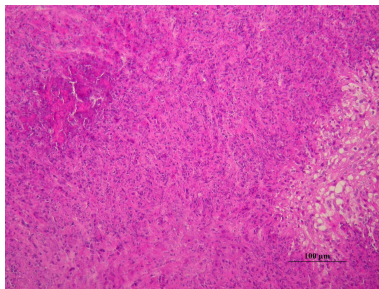
Par ailleurs, la taille des lésions varie d'assez petite (invisible à l'œil nu), à l'implication d'une part importante de l'organe (OIE, 2008a).

### III.1.2.2. L'examen histopathologique

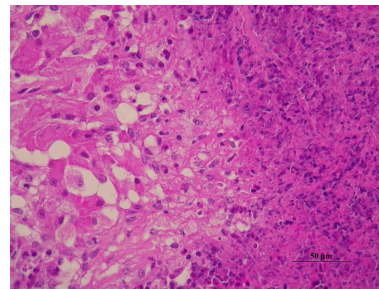
L'examen histopathologique consiste en une analyse microscopique de calques directs à partir d'échantillons cliniques (présentant des lésions suspectes de Tb), et sur du matériel tissulaire préparé (OIE, 2008a).

Tout d'abord, plusieurs coupes histologiques sont effectuées afin de réaliser les différentes méthodes de coloration.

La coloration classique à l'hémalun-éosine (HE) est une des colorations histologiques de base (Corner L.A., 1994 ; Cassidy J.P. *et al.*, 1999 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006 ; Varello K. *et al.*, 2008). Elle permet de se faire une idée sur l'aspect morphologique du tissu (Figure I.1.5 et Figure I.1.6).

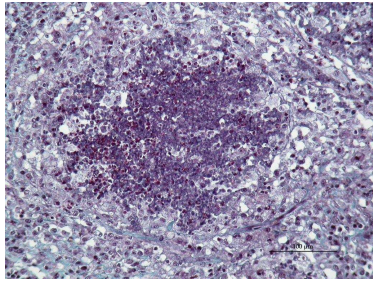


**Photo A.** Echelle précisée sur la photo en bas à droite : 100 µm

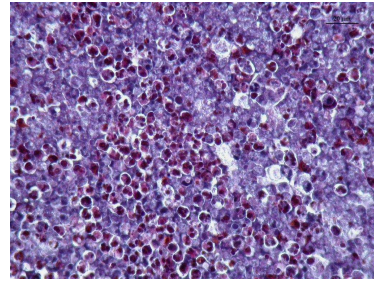


**Photo B.** Echelle précisée sur la photo en bas à droite : 50 µm

**Figure I.1.5.** Coloration HE montrant des lésions évocatrices de tuberculose bovine (Photographies A et B réalisées par le Dr Belli P., ENV Lyon).



**Photo A.** Echelle précisée sur la photo en bas à droite : 100 µm



**Photo B.** Echelle précisée sur la photo en haut à droite : 20 µm

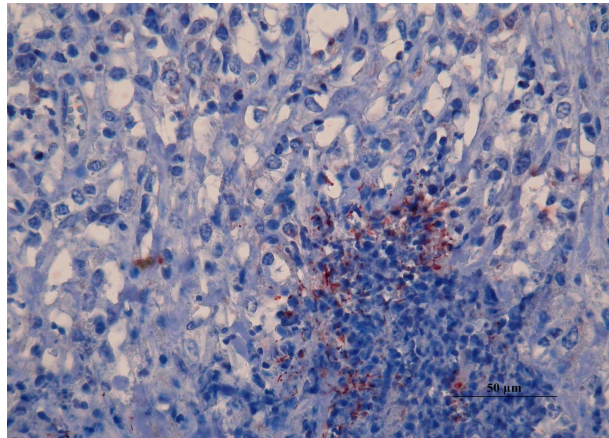
**Figure I.1.6.** Coloration HE montrant des lésions non tuberculeuses, un abcès (Photographies A et B réalisées par le Dr Belli P., ENV Lyon).

Une coloration de Ziehl-Neelsen, spécifique des BAAR doit être également réalisée (Gutiérrez C.M.M. et Martin J.F.G., 1993 ; Cassidy J.P. *et al.*, 1999 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007 ; OIE, 2008a ; Parra A. *et al.*, 2008 ; Varello K. *et al.*, 2008). En effet, lors de cette coloration, les acides mycoliques des mycobactéries (dont les bacilles tuberculeux) fixent directement la fuschine et la retiennent au niveau du cytoplasme, assurant ainsi l'intensité et la réfringence de la coloration. Ils constituent ensuite une barrière physique prévenant l'action décolorante de l'acide sulfurique et de l'alcool à 90° (Vincent V., 1995). Enfin, une contre-coloration au bleu de méthylène est réalisée. Les BAAR apparaissent alors roses sur fond bleu de la préparation. Ils sont retrouvés aussi bien dans le cytoplasme des macrophages épithélioïdes et des cellules géantes qu'au niveau de nécroses caséuses (Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).

De plus, une autre technique spécifique des BAAR peut être réalisée en complément : la coloration à l'auramine O/rhodamine (AOR). Cette coloration repose sur le même principe que celle de Ziehl-Neelsen (ZN) mais les lames sont examinées au microscope à fluorescence et les mycobactéries émettent une fluorescence orange-jaune sur un fond noir (González Llamazares O.R. *et al.*, 1999a ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006). En outre, l'immunohistochimie (IHC) basée sur des anticorps monoclonaux anti-*M. bovis* peut être utilisée. Cette méthode consiste en une coloration des antigènes mycobactériens (liés aux anticorps anti-*M. bovis*) dans les coupes (Gutiérrez C.M.M. et Martin J.F.G., 1993 ; Cassidy J.P. *et al.*, 1999 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).

Cependant, la présence de BAAR dans ces coupes histologiques peut ne pas être détectée bien que *M. bovis* puisse être isolé en culture (OIE, 2008a). Cela est notamment dû au fait que non

seulement les tissus lésés présentent souvent peu de BAAR mais aussi que ces BAAR se trouvent en amas. Néanmoins, la technique immunohistochimique semble être plus sensible que les deux autres techniques (ZN et AOR) mais, elle est plus coûteuse et semble moins spécifique (Figure I.1.7) (Guttierez C.M.M. et Martin J.F.G., 1993 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).



**Figure I.1.7.** Coupe immunohistochimique montrant des lésions évocatrices de tuberculose bovine (Photographie (échelle précisée en bas à droite : 50 µm) réalisée par le Dr Belli P., ENV Lyon).

En outre, les procédures de coloration, ZN et AOR, ne sont pas spécifiques des bacilles tuberculeux mais des mycobactéries en général (bactéries de la famille des *Mycobacteriaceae*).

Par conséquent, ces deux méthodes de coloration sont donc rapides mais elles manquent de spécificité et dans une moindre mesure de sensibilité pour confirmer le diagnostic de la Tb (Zumárraga M.J. *et al.*, 2005).

Toutefois, le diagnostic présomptif de mycobactériose peut être établi si le tissu présente des lésions histologiques caractéristiques : gros granulome (tubercule) avec au centre une zone de nécrose caséuse visible, entourée par des macrophages épithélioïdes associés aux cellules géantes multinucléées de Langhans et, en périphérie, des zones présentant des macrophages associés à des lymphocytes en amas et des neutrophiles dispersés près de la capsule fibreuse périphérique (Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).

En résumé, l'examen histopathologique est donc un test de diagnostic de la Tb beaucoup plus rapide (résultat transmis sous une huitaine jours par rapport à la prise d'essai) et aussi sensible



que la bactériologie mais manquant considérablement de spécificité (WatreLOT-Virieux D. *et al.*, 2006).

### III.1.2.3. L'examen bactériologique

L'examen bactériologique à partir d'échantillon de tissus lésés comprend l'isolement d'agent pathogène sur milieux de culture adéquats et l'identification de la souche à partir de coloration de ZN et de tests biochimiques et/ou moléculaires. Cette technique est la méthode de référence, le « Gold standard », pour diagnostiquer la maladie. Elle est sensible et très spécifique de *M. bovis* et permet le typage des souches par la suite. Néanmoins, la culture est délicate (laborieuse) et le délai de réponse est relativement long (3 mois) (Liébana E. *et al.*, 1995 ; Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les mycobactéries induisant la Tb sont considérées comme des microorganismes de classe 3. Cette classe comprend en effet, les microorganismes pathogènes à haut risque ne devant être manipulés que par des microbiologistes spécialement formés et vaccinés (si le vaccin existe). De plus, un laboratoire de confinement ou niveau de sécurité biologique 3 (NSB3) est obligatoire pour la manipulation de produits susceptibles de contenir ces agents pathogènes de catégorie 3 (Programme N°116/02, version en vigueur de 2003).

#### III.1.2.3.1. La Culture

La méthode pour la recherche des bacilles tuberculeux par culture (exposée dans ce travail) sur milieu solide est celle recommandée par la norme NF U 47-104 (version en vigueur de 2003) (Cf. Annexe III).

##### III.1.2.3.1.1. Les traitements des échantillons

L'isolement des mycobactéries à partir de prélèvements souillés nécessite la mise en œuvre préalable de procédés spécifiques de décontamination susceptibles de concilier une action énergique à l'égard de la flore banale et une agressivité très faible vis-à-vis des BAAR. (Thorel M.F., 1982). En effet, la culture des mycobactéries à croissance lente, comme *M. bovis*, peut être masquée par le développement plus rapide des bactéries contaminantes.

Le choix du traitement de ces produits pathologiques pluri-microbiens (mycobactéries associées à d'autres germes pathogènes et commensaux), avant la mise en culture, est

fonction de la nature même de ces produits (tissus, lait, fèces, eaux, expectorations, prélèvements de l'environnement) (Cf. Annexe I).

De plus, le temps de contact entre le prélèvement et l'agent de décontamination est critique car la résistance des mycobactéries n'est pas absolue. En effet, il s'agit de détruire la flore indésirable pour éviter les contaminations ultérieures des cultures sans pour autant détruire les mycobactéries. Toutefois, cette étape entraîne inévitablement une perte bien que minimale de sensibilité de la culture mycobactérienne.

L'action de ces agents est toujours suivie d'une phase de neutralisation (Euzeby J.P., Site web [2g]).

L'agent chimique approprié pour la décontamination des échantillons de tissus bovins (ganglion, poumon, foie,...), préconisé par le Laboratoire national de référence de la Tb en France, l'Afssa-Lerpaz et par la norme AFNOR (Association Française de Normalisation) NF U 47-104 relative à l'isolement des mycobactéries autres que *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* chez l'animal (AFNOR, 2003), est l'acide sulfurique à 4 %. En effet, selon Grumbach en 1966, il convenait parfaitement à la décontamination des tissus. De plus, l'étude de Thorel M.F. et Boisvert H. en 1976, avait montré son efficacité, c'est-à-dire la sensibilité des mycobactéries à croissance rapide et la relative résistance des mycobactéries à croissance lente (notamment tuberculeuses) vis-à-vis d'un traitement de 10 minutes à l'acide sulfurique à 4 % (Thorel M.F. et Boisvert H., 1976).

#### III.1.2.3.1.2. Les milieux de culture

Les mycobactéries, relativement résistantes aux agressions chimiques et physiques, se différencient de la plupart des autres germes par leurs exigences métaboliques (Thorel M.F., 1982). La culture des bacilles tuberculeux est réalisée sur des milieux sélectifs tels que les milieux solides à l'œuf de Löwenstein-Jensen<sup>®</sup> (LJ) et de Coletsos<sup>®</sup> (Col) (Cf. Annexe II).

Il existe également des milieux de culture liquides spécifiques tels que Bactec, MGIT. Cependant, ils ne sont à ce jour utilisés qu'en santé humaine. En effet, ces milieux ont été développés pour le diagnostic humain et par conséquent, ont été adaptés aux différents types d'échantillons humains (expectoration, tissus (biopsie) souvent moins contaminés par une flore indésirable que les prélèvements animaux) et en particuliers à leurs méthodes de décontamination.

### III.1.2.3.2. L'identification de l'agent pathogène.

L'identification de l'agent pathogène à partir de colonies isolées s'effectue par un ensemble de tests : A partir de la primo-culture (sur milieu LJ ou Col), la coloration de ZN pour l'aspect microscopique des BAAR et à partir de subcultures, des épreuves biochimiques permettant la détermination des caractères phénotypiques – c'est-à-dire des caractères cultureux : selon la classification de Runyon, la vitesse de croissance, la température optimale croissance et la pigmentation, ainsi que la croissance en présence d'inhibiteurs ou gélose ordinaire – et des caractères enzymatiques (plusieurs enzymes testées) (méthode utilisée par l'Afssa-Lerpaz, selon David H., Levy-Frebault V. et Thorel M.F., 1989) (Cf. Annexe IV).

Cependant, les tests enzymatiques sont peu à peu remplacés par un ensemble de tests plus rapides, c'est à dire des analyses PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne) spécifiques des agents pathogènes recherchés (Cf. Annexe IV).

### III.1.2.4. Le typage moléculaire des isolats de *M. bovis*

Après l'identification de *M. bovis*, le typage moléculaire de ces isolats peut être réalisé afin d'affiner la caractérisation des souches.

Le typage moléculaire de *M. bovis* s'avère très utile dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. Il permet de distinguer entre eux des isolats de *M. bovis* d'origine différentes et ainsi de préciser les sources probables d'infection (Durand B. *et al.*, 2004).

Les techniques de typages moléculaires des mycobactéries du MTBC (en particulier *M. bovis*) les plus utilisées sont le spoligotypage et le typage sur base de VNTRs (Variable Number Tandem Repeats ou séquences répétées en tandem en nombre variable). Ces techniques standardisées présentent un bon équilibre entre leur capacité de discrimination et leur stabilité (Allix C. *et al.*, 2006 ; Walravens K. *et al.*, 2006) (Cf. Annexe V).

## III.2. Les méthodes complémentaires et nouveaux outils de diagnostic de la Tb

### III.2.1. Les méthodes *in vitro* de diagnostic *ante mortem*

Face à certaines limites que présentent les IDT, d'autres tests, basés cette fois-ci sur l'étude *in vitro* de la réponse cellulaire, se sont développés, comme le test de dosage d'interféron gamma. L'exploration de la réponse humorale, bien que non protectrice face à une infection

de tuberculose, semble aussi dans certains cas présenter un intérêt par rapport aux méthodes conventionnelles.

### III.2.1.1. Le sérodiagnostic de la Tb : généralités sur les tests sérologiques

Les tests sérologiques sont basés sur la réponse immunitaire à médiation humorale, c'est-à-dire la détection d'anticorps (Ac) spécifiques dirigés contre des antigènes (Ag) mycobactériens immunogènes de diverses natures.

Les PPD habituellement utilisées comme Ag mycobactériens pour les tests de sérodiagnostic de la Tb sont désormais souvent remplacées par des Ag protéiques spécifiques du MTBC tels que MPB70 et MPB83 (protéines majeures sécrétées par les cellules des bactéries du MTBC), ESAT6 (*early secreted antigenic target* de 6 kDa, protéine majeure au début de l'infection). En effet, ces Ag présentant de nombreux épitopes reconnus par les lymphocytes B (Ag sérodominants) permettent d'améliorer la spécificité des tests sérologiques (Wood P.R. *et al.*, 1992 ; Lyashchenko K.P. *et al.*, 1998 ; Lightbody K.A., *al.*, 1998 ; Lilenbaum W. *et al.*, 1999 ; Amadori M. *et al.*, 2002 ; Carr M.D. *et al.*, 2003 ; Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Coad M. *et al.*, 2008).

Parmi les tests de sérodiagnostic de la Tb, la technique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* ou test d'immunoabsorption par enzyme liée, c'est-à-dire test de dosage immunoenzymatique sur support solide) est celle que l'on retrouve principalement dans la littérature (Ritacco V. *et al.*, 1988 et 1991 ; Harboe M. *et al.*, 1990 ; Hanna J., Neill S.D. et O'Brien J.J., 1992 ; Lightbody K.A. *et al.*, 1998 ; Lilenbaum W. *et al.*, 1999 et 2006) (Cf. Annexe VI).

Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (*Enzyme ImmunoAssays* ou tests immunoenzymatiques), dans lesquels le dosage est basé sur une réaction catalysée par une enzyme qui sur un substrat chromatogène libère un composant coloré mesuré par spectroscopie, par opposition aux RIA (*Radio ImmunoAssays* ou radio-immunoessais) dans lesquels le dosage est basé sur des Ac marqués par un radioélément permettant la mesure d'un signal radioactif (Burmester G.R., Pezzutto A. et Wirth J., 2000 ; Site web [11]).

On peut retrouver également d'autres tests sérologiques, comme les tests commerciaux MAPIA<sup>®</sup> de Chembio (*Multi-antigen Print Immunoassay*) reposant sur la détection d'immunoglobulines G (Ac) par un challenge de plusieurs Ag dans le même test et basé sur l'immunochromatographie (Palmer M.V. *et al.*, 2006a).

Il existe aussi des tests rapides reposant sur le même principe que MAPIA<sup>®</sup> (*Lateral Flow Immunoassay*, l'immunochromatographie mais à flux latéral), comme le test BovidTB STAT-PAK<sup>®</sup> de Chembio ou le test Bovine Tb Ab<sup>®</sup> d'Anigen. Ces tests rapides se présentent sous la forme d'une petite cassette en plastique dans laquelle une bandelette test unique est placée. Cette bandelette est une membrane de nitrocellulose sur laquelle sont imprégnés des Ag. Le système de révélation des anticorps est simple : des particules de latex bleu sont conjuguées aux protéines détectant les complexes Ac-Ag formés.

Les tests sérologiques suscitent donc un intérêt pour le dépistage de la Tb, dans la mesure où ils sont peu coûteux et que contrairement aux IDT, ils sont réalisés à partir d'une simple prise de sang. Néanmoins, comme la réponse immunitaire humorale se déclenche tardivement par rapport à la réponse immunitaire cellulaire (*prédominant les premiers stades de l'infection*) (Figure I.1.4), (Ritacco V. *et al.*, 1991 ; Buddle B.M. *et al.*, 1995 ; Pollock J.M. et Neill D., 2002 et Vordermeier H.M. *et al.*, 2006b), la recherche d'Ac spécifiques d'Ag mycobactériens semble donc intéressante seulement pour la détection de cas de Tb en stades plutôt avancés, c'est-à-dire pour le diagnostic de la Tb dans des populations où l'infection est installée voire endémique (animaux malades, faune sauvage, p. ex). [par exemple, les anergiques (Plackett P. *et al.*, 1989)].

En effet, les tests sérologiques pour un dépistage en début d'infection ont une sensibilité généralement faible par rapport aux tests basés sur l'immunité à médiation cellulaire (IDT et test de dosage d'interféron gamma). L'utilisation d'Ag sérodominants permet d'améliorer leur spécificité sans toutefois améliorer leur sensibilité (Tableau I.1.3) (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Buddle B.M., Livingstone P.G. et De Lisle G.W., 2009). Leur sensibilité augmente principalement avec la sévérité de la maladie (lésions modérées à sévères) [Gutiérrez M. *et al.*, 1998 (étude à partir d'un test ELISA-AgPPD sur des caprins)]. Par ailleurs, des études ont montré que les réponses en Ac engagées contre *M. bovis* (Ag) peuvent être boostées par l'IDT (réponse anamnesticque) (amélioration de la sensibilité (Tableau I.1.3)), (Gutiérrez M. *et al.*, 1998 ; Thom M. *et al.*, 2004 ; De la Rua-Domenech R., 2006a ; Cf. Tableau I.1.3).

Néanmoins, ces tests ne doivent pas être utilisés comme test de confirmation de Tb à l'abattoir (Fráguas S.A. *et al.*, 2006).

## III.2.1.2. La technique de dosage d'interféron gamma

## III.2.1.2.1. L'interféron gamma

Les interférons sont des protéines naturelles produites par les cellules du système immunitaire de la plupart des animaux en réponse aux attaques d'agents étrangers tels que les virus, bactéries, cellules tumorales. Ils font partie d'une classe de glycoprotéines, les cytokines. Il existe deux types d'interféron qui diffèrent structuralement et fonctionnellement : le type I inclue les interférons alpha et bêta et, le type II comprend uniquement l'interféron gamma (interféron immun) (De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Site web [13]).

L'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) est une lymphokine, puisqu'il est principalement libéré par les lymphocytes thymodépendants (de type CD4<sup>+</sup> principalement et, CD8<sup>+</sup> et  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup>) activés en réponse à une stimulation antigénique *in vivo* comme *in vitro* (Flynn J.L. *et al.*, 1993 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000a ; Waters W.R. *et al.*, 2000 ; Walravens K. *et al.*, 2001 ; Pollock J.M. *et al.*, 2001, 2005 et 2006). Il peut être également produit à moindre mesure par les cellules NK (*Natural Killer*) en réponse à certains Ag (Flynn J.L. *et al.*, 1993 ; Olsen I. *et al.*, 2005 ; Site web [13]).

Outre ses propriétés antivirales, l'IFN $\gamma$  est impliqué dans l'immunité à médiation cellulaire contre les infections bactériennes.

En effet, l'IFN $\gamma$  est le principal médiateur dans l'activation de la fonction phagocytaire des macrophages (Flesch E. et Kaufmann S.H., 1990 ; Flynn J.L. *et al.*, 1993 ; Carpenter E., Fray L., et Gormley E., 1997 ; Ng K.H. *et al.*, 1997 ; Waters W.R. *et al.*, 2000 ; Walravens K. *et al.*, 2001 ; Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a). Il joue aussi un rôle important dans la croissance et la différenciation des lymphocytes T (LT) cytotoxiques (rétrocontrôle positif par activation des LT) qui vont activer les cellules NK et se conduire comme des facteurs de maturation des lymphocytes B (LB).

De même, c'est un facteur de différenciation des LB. Enfin, il permet l'induction de l'expression de protéines membranaires, comme les Ag de classes 1 et 2 (Site web [13]).

L'IFN $\gamma$  est donc une cytokine cruciale pour le contrôle des infections mycobactériennes (Ng K.H. *et al.*, 1997 ; Walravens K. *et al.*, 2001 ; Buddle B.M. *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il est important de souligner que l'IFN $\gamma$  est spécifique de l'espèce animale infectée et non du pathogène qui déclenche sa production (Rothel J.S. *et al.*, 1990).

De plus, il peut être libéré *in vitro* en quantité suffisante pour être mesuré par une méthode ELISA en « sandwich » (Wood P.R. *et al.*, 1990a ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

#### III.2.1.2.2. Historique et principe du test de dosage d'IFN $\gamma$

A la fin des années 1980, un test de dosage d'IFN $\gamma$  a été développé en Australie pour le diagnostic de la Tb, en combinaison avec l'IDS (Wood P.R., Corner L.A. et Plackett P., 1990b ; Wood P.R. *et al.*, 1991 et 1994 ; Rothel J.S. *et al.*, 1990). En effet, des travaux de stimulation cellulaire *in vitro* ont montré qu'il était possible en incubant des échantillons de sang total avec des Ag tuberculeux, de stimuler la production de, l'IFN $\gamma$  par des LT déjà sensibilisés (Wood P.R. *et al.*, 1990ab, 1991 ; Rothel J.S. *et al.*, 1990).

Le test de dosage d'IFN $\gamma$  développé est donc un test sanguin permettant d'évaluer *in vitro*, la réactivité des LT circulants stimulés par Ag mycobactériens (tuberculines), à travers la détection et le dosage d'IFN $\gamma$ .

Il est basé sur le principe que des LT préalablement sensibilisés à ces Ag (LT de bovins infectés par *M. bovis*, par exemple\*) produisent en réponse (HSR *in vitro*) à une exposition à des tuberculines (bovines\*), des quantités d'IFN $\gamma$  mesurables par une méthode ELISA en « sandwich » basée sur des anticorps monoclonaux anti-IFN $\gamma$ .

Les premières études d'évaluation terrain de ce test, ont été menées sur des bovins et des buffles expérimentalement et naturellement infectés par *M. bovis* (Rothel J.S. *et al.*, 1990 ; Wood P.R. *et al.*, 1990b et 1991). Elles ont permis d'aboutir à la commercialisation de kits de dosage d'IFN $\gamma$  par méthode ELISA en « sandwich ».

Ainsi, le laboratoire Biosource (*Belgique*) commercialise le test « Bovine IFN $\gamma$  EASIA™ » (distribué en France par CliniSciences). Le laboratoire Biocor (*Commonwealth Serum Laboratories (CSL), Australie*) commercialisait le test Bovigam® de 1988 à 2005. Désormais, ce test est distribué par la société suisse Prionics (distribué en France par AES).

#### III.2.1.2.3. Le test IFN $\gamma$ Bovigam®

##### III.2.1.2.3.1. Principe du test Bovigam®

Le test Bovigam® est un test sanguin de dosage d'IFN $\gamma$  pour le diagnostic rapide de la Tb pour les bovins, ovins, caprins et autres bovidés tels que les buffles (Cf. Notice, site web [13]).

– Il existe des tests pour les primates non humains (Primagam<sup>®</sup>), pour les cervidés (Cervigam<sup>®</sup>), pour les humains (Quantiferon<sup>®</sup> et Quantiferon Gold<sup>®</sup>). –

Le test Bovigam<sup>®</sup> permet donc de déceler l'infection à *M. bovis*, chez les bovins, ovins, caprins et autres bovidés, par la détection de la production d'IFN $\gamma$  dans le plasma, après mise en évidence de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, résultant de l'exposition du sang total à des tuberculines bovines (Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

#### III.2.1.2.3.2. Méthode Bovigam<sup>®</sup>

Le test Bovigam<sup>®</sup> comporte donc deux phases : la stimulation cellulaire, en particulier lymphocytaire, par incubation des prélèvements sanguins avec des Ag spécifiques puis, le dosage d'IFN $\gamma$  libéré dans chaque plasma, par la méthode ELISA en « sandwich » basée sur des anticorps monoclonaux spécifiques de l'IFN $\gamma$  bovin (mais aussi ovins, caprins et autres bovidés) (mode opératoire, cf. Annexe VII). Ces anticorps ne reconnaissent pas les IFN $\gamma$  des porcins, des cervidés et de l'Homme (Wood P.R. *et al.*, 1990ab ; Rothel J.S. *et al.*, 1990 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

L'étape de stimulation lymphocytaire requiert un minimum de 5 ml de sang collectés et homogénéisés dans un tube contenant de l'héparine (anticoagulant).

De plus, pour être valable, ce test doit être mis en œuvre sur des prélèvements sanguins pour lesquels les lymphocytes sont encore viables et capables de réagir en produisant, le cas échéant de l'IFN $\gamma$ .

Ainsi, la notice du kit Bovigam<sup>®</sup> préconise de conserver le tube de sang à une température de 22°C  $\pm$  5°C (température ambiante) et, de réaliser la stimulation cellulaire au maximum 30 h après la prise de sang sur l'animal, si une IDT a été appliquée entre 3 et 30 jours avant le prélèvement sanguin. Ce délai maximum est réduit à 8 h si aucune IDT n'a été réalisée entre 3 et 30 jours avant la prise de sang (Rothel J.S. *et al.*, 1992).

En Grande Bretagne (GB), Nouvelle Zélande (NZ) et aux Etats-Unis d'Amérique (EUA), le délai maximal est de 24 h après une IDT [Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 (*NZ : un délai de 28 h n'entraîne aucun effet sur la sensibilité et la spécificité du test*); Vordermeier H.M. et Ewer K., 2006a (*GB*)].

Néanmoins, Wood P.R. *et al.* en 1991, annonçaient un temps limite de 12 h entre la prise de sang et le début de l'analyse.



De plus, certains auteurs recommandent un délai maximal de 8 h pour éviter une baisse de sensibilité du test [Rothel J.S. *et al.* en 1992 (*Australie : baisse de 30 % des valeurs de densité optique (DO) obtenues à 24 h*) ; González Llamazares O.R. *et al.*, 1999b et Aranaz A. *et al.*, 2006 (*Espagne : recommandation 8 h*) ; Whipple D.L. *et al.*, 2001 (*EUA : diminution des valeurs de DO entre 2 h et 24 h en cas de non-application d'IDS récente*) Gormley E. *et al.*, 2004 et 2005 (*Irlande : chute des valeurs de DO à 24 h*) ; Cagiola M. *et al.*, 2004 (*Italie : recommandation 8-10 h*) ; Schiller I. *et al.*, 2009)].

La probabilité qu'un échantillon sanguin positif en IFN $\gamma$  analysé 8 h après la prise de sang (PS+8 h) reste positif à PS+24 h, dépend de l'amplitude de la réponse au test à PS+8 h (Gormley E. *et al.* en 2005 : 76 % des animaux positifs en IDT et en IFN $\gamma$  à 8 h restent positifs en IFN $\gamma$  à 24 h) (Waters W.R. *et al.*, 2007).

#### III.2.1.2.3.3. Conditions d'utilisation du test Bovigam<sup>®</sup>

Selon les indications décrites dans la notice, le test Bovigam<sup>®</sup> est proposé pour un usage après une IDT. Le test IFN $\gamma$  est alors utilisé comme test de confirmation de réactions positives et négatives entre 3 et 30 jours après l'application de l'IDT chez l'animal.

#### III.2.1.2.3.4. Interprétation des résultats du test Bovigam<sup>®</sup>

Avant de procéder à l'interprétation des résultats des échantillons, le bon déroulement de l'analyse (« run » ELISA) doit être contrôlé par la vérification des résultats obtenus pour les témoins positif (TP) et négatif (TN) analysés en triple.

En effet, le TP (présence d'IFN $\gamma$  recombinant) permet de confirmer que les Ac anti-IFN $\gamma$  de capture sont bien fixés au fond du puits, mais aussi que les Ac anti-IFN $\gamma$  traceurs sont marqués par l'enzyme *peroxidase de raifort* (HRP). Le TN (absence d'IFN $\gamma$ ) permet de s'assurer de l'absence de fixation non spécifique des Ac anti-IFN $\gamma$  marqués à la HRP.

Ainsi, pour valider l'analyse ELISA (par plaque ELISA), les valeurs moyennes de DO (moyenne des 3 valeurs de DO) obtenues pour ces témoins, doivent répondre aux critères suivants :

Pour le TN :  $DO_{TN} < 0,130$  et  $dTN < 0,04$  ( $dTN$  : écart entre les 3 valeurs de DO de TN (moyenne des DO des *triplicats* de TN)).

Pour le TP :  $DO_{TP} > 0,700$  et  $CV_{TP} < 30 \%$  [( $CV_{TP}$  : coefficient de variation de TP), les DO des *triplicats* de TP ne doivent pas varier de plus de 30 % de leur absorbance moyenne ( $DO_{TP}$ )].

Après la validation de la série d'analyses par les témoins, les résultats des échantillons peuvent être interprétés. L'interprétation du test Bovigam<sup>®</sup> est basée sur le même principe que celui de l'IDC. En effet, il s'agit de comparer les réponses en IFN $\gamma$  obtenues pour les deux Ag tuberculeux, PPDB et PPDA. En raison d'une parenté plus grande de *M. avium* avec *M. avium paratuberculosis* et diverses mycobactéries atypiques qu'avec les bacilles tuberculeux bovins (et humains), l'exposition à une mycobactérie atypique ou *M. avium paratuberculosis* préalable au test se traduira par une réponse en IFN $\gamma$  plus intense à PPDA qu'à PPDB et inversement pour une exposition à une mycobactérie du MTBC (Wood P.R. et Rothel J.S., 1994 ; Bénet J.J., 2008).

Néanmoins, il arrive qu'une réponse positive à PPDB s'accompagne d'une réponse positive à PPDA mais généralement de moindre intensité (réaction croisée) dans le cas de double contamination par *M. bovis* et *M. avium* ou par *M. bovis* et une mycobactérie atypique (Wood P.R., Corner L.A. et Plackett P., 1990 ; Wood P.R. et Rothel J.S., 1994).

Comme chaque échantillon est analysé en double, les moyennes des deux valeurs de DO du PBS (*phosphate buffer saline* noté N), de PPDB et de PPDA sont calculées pour chaque échantillon.

Ainsi, un échantillon est considéré comme positif lorsque la valeur de DO obtenue à l'issu du calcul « DO<sub>PPDB</sub> – DO<sub>PPDA</sub> » est supérieure ou égale à 0,1 et que la valeur de DO obtenue à l'issu du calcul « DO<sub>PPDB</sub> – DO<sub>N</sub> » est supérieure ou égale à 0,1 (Wood P.R. and Rothel J.S., 1994) (Tableau I.1.2). Un résultat positif à ce test indique donc la présence d'une infection à *M. bovis* chez l'animal testé.

**Tableau I.1.2.** Critères d'interprétation des résultats du test.

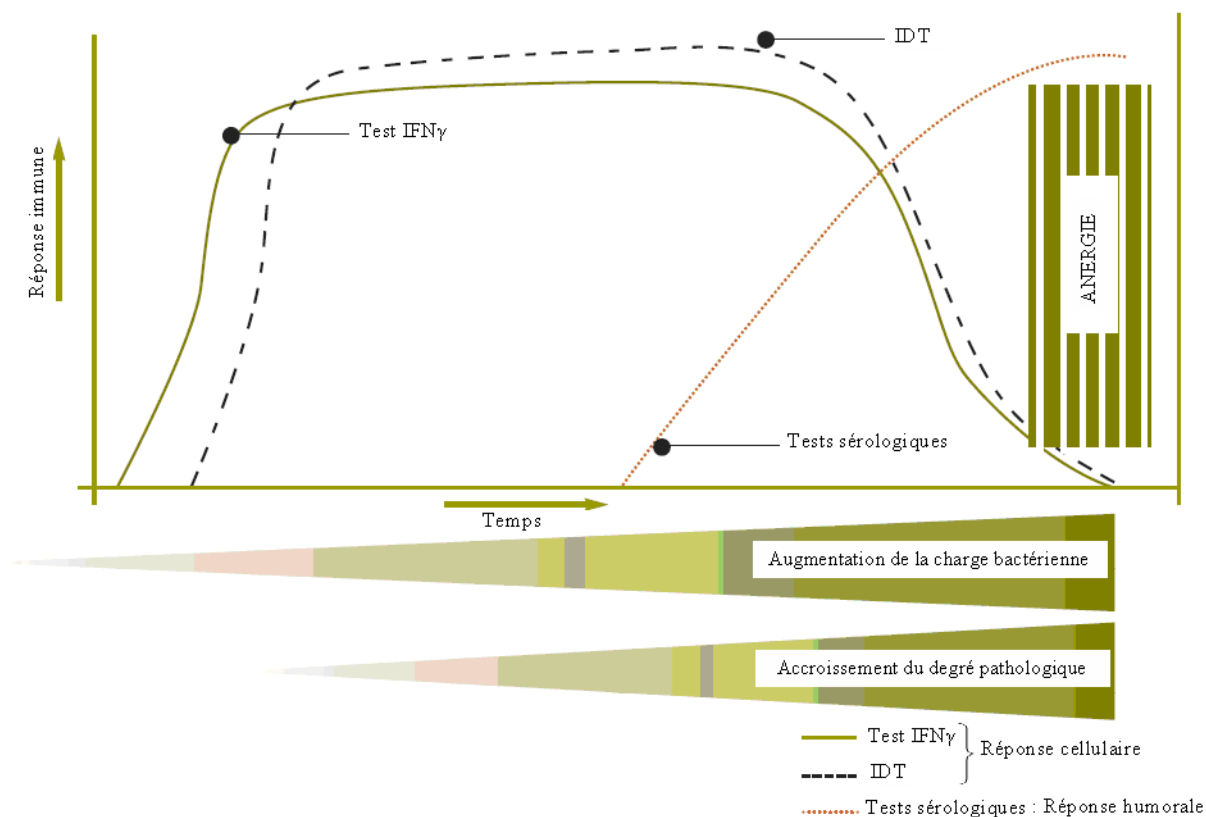
<b>Critères</b> (la DO correspond à la moyenne des 2 DO obtenues)	<b>Interprétation des résultats</b>
$DO_{PPDB} - DO_{PPDA} \geq 0,1$ et $DO_{PPDB} - DO_N \geq 0,1$	POSITIF
$DO_{PPDB} - DO_{PPDA} < 0,1$	NEGATIF
$DO_{PPDB} - DO_N < 0,1$	NEGATIF

Cependant, la littérature montre que le critère d'interprétation des résultats du test IFN $\gamma$  peut être adapté aux conditions d'application. Ainsi, le seuil de positivité peut être ajusté pour augmenter les performances du test, c'est-à-dire pour obtenir une valeur élevée en sensibilité ou en spécificité, selon la situation épidémiologique rencontrée (Wood P.R. *et al.*, 1991 et 1992 ; Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 ; Lauzi S. *et al.*, 2000 ; Wood P.R. et

Jones S.L., 2001 ; Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; Walravens K. *et al.*, 2002 ; Gormley E., 2005 ; Buddle B.M., Livingstone P.G. et De Lisle G.W., 2009). De même, d'autres modes de calcul pour l'interprétation des résultats du test IFN $\gamma$  peuvent être utilisés (Wood P.R. *et al.*, 1991 ; Whipple D.L. *et al.*, 1995 ; Gutiérrez M. *et al.*, 1998 ; Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 ; Lauzi S. *et al.*, 2000 ; Walravens K. *et al.*, 2002 ; Olsen I. *et al.*, 2005 ; Aranaz A. *et al.*, 2006).

### III.2.1.2.3.5. Avantages du test Bovigam<sup>®</sup>

Comme pour l'IDT, le test IFN $\gamma$ , basé sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire, permet la détection précoce de l'infection. Toutefois, la réponse est développée (production importante d'IFN $\gamma$ ) plus précocement que celle détectable en IDT, soit en une à cinq semaines après l'infection (trois à six semaines pour les IDT), (Figure I.1.8), (Neill S.D. *et al.*, 1994a ; Buddle B.M. *et al.*, 1995 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005 ; Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006b ; Coad M. *et al.*, 2008).



**Figure I.1.8.** Représentation graphique du spectre des réponses pathologiques et immunitaires à médiation cellulaire (aux tests IFN $\gamma$  et IDT) et à médiation humorale (aux tests sérologiques) du bétail infecté par *M. bovis* (d'après De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006b).

Le test IFN $\gamma$  est généralement considéré comme au moins aussi sensible que l'IDS et plus sensible que l'IDC (Tableau I.1.3), (Wood P.R. *et al.*, 1991 et 2001; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006 ; Coad M. *et al.*, 2008). En effet, il a été amplement montré que le test IFN $\gamma$  peut détecter une importante proportion d'animaux infectés non-détectés par IDT (Neill S.D. *et al.*, 1994a ; Pollock J.M. *et al.*, 2001 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a). Ceci résulte principalement du fait qu'il permet de déceler l'infection plus tôt que l'IDT (Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Comme pour l'IDC, l'évaluation comparée de la réaction aux tuberculines, PPDA et PPDB pour le test IFN $\gamma$  permet généralement de faire la différence avec une simple exposition à une mycobactérie environnementale et améliore la spécificité (bien que faible en apparence (De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a)) par rapport à l'IDS (Wood P.R. et Rothel J.S., 1994 ; Buddle B.M. *et al.*, 1995 ; Bénét J.J., 2008). De même, il permet de différencier les animaux vaccinés contre la paratuberculose avec une IDS positive, des animaux présentant une Tb (Buddle B.M. *et al.*, 2003).

En outre, la flexibilité inhérente du critère d'interprétation du test IFN $\gamma$  constitue un bénéfice majeur puisque l'interprétation du test peut être adaptée à la situation épidémiologique rencontrée. Ainsi, dans le cas de programme d'éradication dans des zones à prévalence élevée en Tb ou même, dans le cas seulement de cheptels suspectés de Tb, la valeur du seuil décisionnel (de positivité) du test IFN $\gamma$  peut être ajustée pour améliorer la sensibilité du test (et aboutir à une meilleure détection des animaux infectés), sans toutefois trop réduire sa spécificité (Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la réalisation du test IFN $\gamma$  est trois fois plus rapide (résultat obtenu en un peu plus de 24 h minimum) que les IDT (minimum 72 h).

De plus, sa réalisation et son interprétation par le laboratoire le rendent indépendant des acteurs du terrain (ce qui permet d'éviter les fraudes, par exemple).

En effet, la réaction immunitaire est objectivement mesurée en laboratoire par DO alors que la lecture de l'IDS est faite sur l'animal, généralement de façon subjective (visuel, palpation), et celle de l'IDC de manière quantitative par mesure du pli de peau au cutimètre.

Il suffit également d'une seule visite sur l'exploitation (pour réaliser la prise de sang) alors que l'IDT en nécessite deux (pour sa réalisation et la lecture du résultat). L'utilisation du test

IFN $\gamma$  permet aussi de réduire les problèmes pratiques associés aux IDT (contention des animaux) qui contribuent à une sous-détection des animaux infectés.

Enfin, à la différence de l'IDT qui nécessite l'administration d'Ag chez l'animal, ce qui compromet son système immunitaire pendant plus d'un mois, le test IFN $\gamma$  qui nécessite un simple prélèvement de sang de l'animal, n'interfère pas avec son système immunitaire (Rothel J.S. *et al.*, 1990). Ainsi, contrairement aux IDT, il peut être renouvelé à de multiples reprises et sans délai d'attente entre deux examens. Par exemple, en présence de résultat douteux, on peut retester plus rapidement l'animal. Par conséquent, la réalisation du test IFN $\gamma$  permet un gain de temps dans la procédure de diagnostic de la Tb puisque ce test peut être réalisé pour confirmer le résultat positif d'une IDS sans délai d'attente, alors qu'un délai de 6-8 semaines est requis pour une confirmation par IDC (ou une seconde IDS).

#### III.2.1.2.3.6. Les limites du test Bovigam<sup>®</sup>

L'un des inconvénients majeurs du test IFN $\gamma$  conventionnel (basé sur les PPD) est que son coût est élevé bien qu'il ne nécessite qu'une seule visite du vétérinaire sanitaire. De plus, sa spécificité apparente est faible (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a). En effet, la valeur médiane de la spécificité du test IFN $\gamma$  est estimée à 96,6 % ([85,0 - 99,6] %) selon De la Rua-Domenech R. *et al.* (2006a) (étude de Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab). Elle est donc relativement basse par rapport à celle de l'IDC qui est estimée à 99,5 % selon De la Rua-Domenech R. *et al.* (2006a).

Toutefois, l'utilisation d'immunogènes spécifiques du MTBC, tels que ESAT6 et CFP10 (*culture filtrate protein*, protéine de 10 kDa) permettent d'augmenter la spécificité du test IFN $\gamma$  (Cf. II.1.2.4.3).

Néanmoins, il a été montré qu'une faible proportion d'animaux contaminés par *M. bovis* réagit aux IDT mais pas au test IFN $\gamma$  (Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005).

Par ailleurs, les conditions de prélèvement sanguin (sur tube hépariné à homogénéiser) et d'acheminement au laboratoire (température et délai à respecter) sont contraignantes car elles doivent permettre de maintenir la viabilité des LT qui seront mis en contact avec les Ag quelques heures au maximum après le prélèvement.

Concernant l'étape de stimulation cellulaire, le test Bovigam<sup>®</sup> n'intègre pas de contrôle positif de la réaction d'activation des LT, pourtant indispensable à l'interprétation des résultats. En effet, la libération d'IFN $\gamma$  est inhibée par des immunosuppresseurs tels que le

cortisol, glucocorticoïde naturel qui est libéré en réponse à un stress [notamment chez les bovins sauvages (camarguais par exemple)] ou des corticostéroïdes qui sont administrés pour traiter des inflammations (dexaméthasone) (Goff B.S.L., 1996). Ces immunosuppresseurs entraînent temporairement une diminution significative, voire une absence, de réceptivité aux IDT (réduction de l'étendue de la réaction cutanée) et de production d'IFN $\gamma$  chez les animaux infectés (Doherty M.L. *et al.*, 1996 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005).

Or, l'utilisation d'un super-Ag non spécifique (mitogène) permet d'évaluer l'immunocompétence d'un animal infecté ou non-infecté, c'est-à-dire la capacité des LT, présents dans son échantillon sanguin, à produire de l'IFN $\gamma$  (réponse T non spécifique).

Parmi les glycoprotéines connues pour être de puissants immunogènes (mitogènes), la littérature décrit l'utilisation de la concanavaline A (conA), du « pokeweed mitogen » (PWM), de l'entérotoxine staphylococcique B (SEB) à partir de *Staphylococcus aureus*, de la phytohémagglutinine P (PHAP) (Stabel J.R., 1996 ; Van Pinxteren L.A.H. *et al.*, 2000 ; Jungersen G. *et al.*, 2002 ; Aagaard C. *et al.*, 2006 ; Aranaz A. *et al.*, 2006 ; Waters W.R. *et al.*, 2007 ; Coad M. *et al.*, 2008 ; Schiller I. *et al.*, 2009).

#### III.2.1.2.4. Applications du test IFN $\gamma$

##### III.2.1.2.4.1. Applications du test IFN $\gamma$ basé sur les PPD

Les essais terrains initiaux du test IFN $\gamma$  ont été réalisés en Australie entre 1989 et 1990 par Rothel J.S., Wood P.R. *et al.*, en combinaison avec l'IDS réalisée au pli sous-caudal (Rothel J.S. *et al.*, 1990 ; Wood P.R. *et al.*, 1991).

L'étude de la sensibilité de l'IDS et du test IFN $\gamma$  a été évaluée sur 6264 bovins et 490 buffles issus de cheptels infectés. Ainsi, ils ont montré que le test IFN $\gamma$  était plus sensible [76,8 % à 93,6 % selon le critère appliqué pour l'interprétation des résultats (*soit 80,8 % pour l'interprétation standard d'un résultat positif si  $DO_{PPDB} - DO_N > 0,5$  et  $DO_{PPDB} > DO_{PPDA}$* )] que l'IDS (65,6 %) pour le diagnostic de la Tb.

L'étude de la spécificité du test IFN $\gamma$  a été évaluée sur 6337 bovins issus de cheptels indemnes depuis au moins 5 ans. Ils ont montré également que le test IFN $\gamma$  était moins spécifique (96,2 % à 98,1 % selon le critère appliqué) que l'IDS (98,8 %, valeur connue en Australie) pour le diagnostic de la Tb (Wood P.R. *et al.*, 1991, 1994 et 2001).

En 1991, ce test a donc été accrédité par le comité en charge de l'agriculture en Australie comme méthode officielle de diagnostic de la Tb dans le pays (Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

Ensuite, la méthode de dosage d'IFN $\gamma$  a été testée dans de nombreux pays du monde (EUA, NZ, Brésil, Espagne, Irlande du Nord, Italie, Roumanie, ...) généralement en parallèle avec les IDT, en particulier l'IDS (Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab ; Cf. Tableau I.1.3 récapitulatif).

Ce test a été approuvé en Nouvelle Zélande comme méthode officielle de diagnostic de la Tb à la fin des années 1990 (pour des animaux avec une IDS positive et lors de suspicion de réaction non-spécifique) et il a été formellement reconnu en 2002 par l'Union Européenne comme test supplémentaire pour une utilisation en parallèle aux IDT (De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Selon l'étude relative à l'évaluation terrain du test dans plusieurs pays depuis sa commercialisation, réalisée par Wood P.R. et Jones S.L. en 2001, plus de 200 000 animaux avaient été testés et la sensibilité du test IFN $\gamma$  variait de 81,8 % à 100 % (confirmation de Tb par culture) et sa spécificité entre 94 % et 100 %.

En 2006, Vordermeier H.M. et Ewer K. ont fait une autre évaluation et ont estimé les valeurs médianes des sensibilités respectives de l'IDS (plis sous-caudal et encolure confondus) et de l'IFN $\gamma$  à 77,7 % et 88,4 %. La valeur médiane de la spécificité de l'IFN $\gamma$  est estimée à 96,6 %.

De plus, la stratégie qui consiste à utiliser l'IDS et l'IFN $\gamma$  en parallèle permet selon Wood P.R. et ses collègues en 1991, d'augmenter la sensibilité globale à 95,2 % (soit 93,6 % pour l'IFN $\gamma$  seul et 65,6 % pour l'IDS seule). L'effet des IDT a été largement décrit dans la littérature (Cf. Paragraphe suivant).

Néanmoins, le fait que la spécificité apparente du test Bovigam<sup>®</sup> soit faible et que son coût soit élevé, constitue un frein à l'utilisation du test pour le dépistage en masse de la Tb dans des régions à faible prévalence de Tb (risque d'abattre de nombreux animaux indemnes) (Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

**Tableau I.1.3.** Résultats exposés par plusieurs auteurs, concernant des études de sensibilité (Se) et /ou de spécificité (Sp), obtenus pour les IDT, le test IFN $\gamma$  (basé sur PPD) après une IDT (IDT & IFN $\gamma$ ) ou indépendamment de l'IDS (test IFN $\gamma$ ) et les tests sérologiques.

Se ou Sp en pourcentage selon l'étude	IDT <sup>1</sup>		Test IFN $\gamma$ <sup>2</sup>		IDT <sup>1</sup> & IFN $\gamma$ <sup>2</sup>		Tests sérologiques	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
Wood P.R. <i>et al.</i> , 1991 (Australie)	IDS c : 65,6	98,8 (Réf.)	93,6*	98,1	<b>95,2*</b>	–	–	–
Wood P.R. <i>et al.</i> , 1992 (Australie)	IDS c : 68,1	IDS c : 96,7	81,8	99,1	–	–	ELISA -Ag MPB70 : 18,1	ELISA -Ag MPB70 : 96,4
Whipple D.L. <i>et al.</i> , 1995 (EUA)	IDC c : 80,4*	–	[55,4-97,1] 73,0 <sup>d*</sup>	–	<b>90,7 <sup>d*</sup></b>	–	–	–
Gutiérrez M. <i>et al.</i> , 1998 (Espagne) sur des caprins	IDC : 83,7	IDC : 100	83,7	96	<b>95,8</b>	<b>96</b>	ELISA -Ag PPDB : 54,9 (J0) 88,6 (J15)	ELISA -Ag PPDB : 88 (J0) 95,8 (J15)
González Llamazares O.R. <i>et al.</i> , 1999b (Espagne)	IDC : 80,2	–	84,9	–	<b>92,9</b>	–	–	–
Lauzi S. <i>et al.</i> , 2000 (Italie)	–	–	–	88,8 (avant IDC)	–	–	–	–
Ryan T.J. <i>et al.</i> , 2000 (NZ)	–	–	–	–	<b>90</b>	<b>93</b>	–	–
Cagiola M. <i>et al.</i> , 2004 (Italie)	–	IDC : 96,8	–	97,3	–	–	–	–
Goodchild A., 2004 (données non publiées)	65,0*	–	70,0 <sup>d*</sup>	–	<b>88,0 <sup>d*</sup></b>	–	–	–
Gormley E. <i>et al.</i> , 2005	IDC : 74 <sup>ISR</sup>	IDC : 99,9 <sup>ISR</sup>	88	95	<b>93</b>	–	–	–
Vordermeier H.M. <i>et al.</i> , 2006b (GB)	77,7	–	88,3	96,6	–	–	–	–
Schiller I. <i>et al.</i> , 2009	–	–	90,9	96,5	–	–	–	–
Marassi C.D. <i>et al.</i> , 2010 (Brésil)	–	–	91,4	86,7	74,3 (7j) 71,4 (21j)	86,7 (7j) 80 (21j)	–	–

**Légende :**

**1 :** Utilisation de différents critères d'interprétation des résultats : une seule méthode mais plusieurs seuils ; **2 :** Utilisation de différents critères d'interprétation des résultats utilisés : plusieurs méthodes et seuils ou « cut off » ; **d :** selon les critères d'interprétation du distributeur ; **\*** : données également extraites des articles de Vordermeier M. *et al.*, 2006ab ; **– :** pas de données ; **IDS c** ou **IDT c :** « c » pour « au pli sous-caudal » ; **J0 :** ELISA basée sur un Ag PPDB, réalisée le jour de l'injection de tuberculines (IDC) ; **J15 :** ELISA basée sur un Ag PPDB, réalisée 15 jours après l'IDC ; **Réf. :** Valeur de référence rapportée. **ISR :** Interprétation sévère du résultat.



III.2.1.2.4.2. Les effets de l'IDT sur le test IFN $\gamma$ ➤ **Les effets de l'IDS sur le test IFN $\gamma$** 

Il a été démontré que la réalisation récente d'une IDS avant le prélèvement sanguin, pouvait modifier le résultat du test IFN $\gamma$  (Tableau I.1.3). En effet, de nombreux articles traitent de l'effet « booster » (activateur) de la réponse en IFN $\gamma$  à partir du 3<sup>ème</sup> jour suivant l'injection de tuberculines PPDB et uniquement chez des bovins infectés (Schiller I *et al.*, 2010). Selon Rothel J.S. et ses collègues (Australie, 1992), cette réponse en IFN $\gamma$  augmente progressivement entre 3 et 5 jours après l'IDS (au pli sous-caudal).

Aux EUA, Palmer M.V. et ses collaborateurs (2006a) ont observé l'effet booster de l'IDS (au pli sous-caudal) entre 3 et 7 jours après l'injection. De même, Whipple D.L. et ses collègues (2001, EUA) ont démontré un effet « booster » de l'IDS (au pli sous-caudal) sur la réponse en IFN $\gamma$  à partir du 3<sup>ème</sup> jour jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour après l'injection. Ils ont remarqué également qu'au 3<sup>ème</sup> jour, la DO était plus élevée après un délai de 24 h entre la prise de sang et la stimulation cellulaire (PS + 24 h) qu'à PS + 2 h. En Irlande, Gormley E. et ses collègues (2004) ont également observé une absorbance plus élevée à PS + 24 h qu'à PS + 8 h. Néanmoins, en NZ, Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W. (2000) ont montré que la sensibilité et la spécificité du test IFN $\gamma$  n'étaient pas affectées par un délai de PS + 28 h, lorsque le test est réalisé entre 8 et 28 jours après l'IDS.

Ainsi, selon ces auteurs, le bénéfice de cet effet « booster » sur le test Bovigam<sup>®</sup> est que l'exposition des échantillons sanguins aux PPD peut être retardée jusqu'au jour suivant l'injection sans réduire la sensibilité du test pour la détection de la Tb. (Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 ; Whipple D.L. *et al.*, 2001 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001; Gormley E. *et al.*, 2004 ; Coad M. *et al.*, 2007).

➤ **Les effets de l'IDC sur le test IFN $\gamma$** 

Au contraire, d'autres auteurs ont montré qu'une IDC réduisait significativement la capacité de réponse à une seconde IDC 7 jours après la première alors que la production en IFN $\gamma$  chez des bovins infectés n'était pas affectée (Doherty M.L. *et al.*, 1995).

Gormley E. (2004), Coad M. (GB, 2007) et leurs collaborateurs respectifs ont montré également, à partir d'études sur des animaux naturellement infectés par *M. bovis*, que l'interprétation du résultat du test Bovigam<sup>®</sup> réalisé 3 jours après une IDC (au pli sous-caudal) ne compromet pas le diagnostic d'animaux infectés. De plus, Coad M. et ses collègues ont remarqué que la conservation de l'échantillon sanguin 24 h avant l'analyse

n'entraîne pas une diminution de la production d'IFN $\gamma$ . Néanmoins, des réductions de l'absorbance (0, 3 ou 10 jours après l'IDC) sont observées à PS + 24 h avant l'analyse lorsque le mélange d'Ag ESAT6 et CFP10, est utilisé à la place des PPD.

Néanmoins, ces résultats ont été controversés par certains auteurs comme Whelan A.O. et ses collaborateurs (GB, 2004). En effet, les auteurs ont montré chez des animaux expérimentalement infectés, une diminution de l'absorbance (réponse en IFN $\gamma$  à PPDB et PPDA) 3 jours après l'IDC, accentuée par une conservation de l'échantillon sanguin 24 h avant l'analyse (par rapport à PS + 8 h). Toutefois, cela n'affecte pas l'interprétation du test Bovigam<sup>®</sup> (basé sur les PPD) alors qu'une réduction du taux de détection des animaux infectés a pu être observée si l'ESAT6, seul ou en mélange avec du CFP10, est utilisé à la place des PPD.

De plus, Marassi C.D., Medeiros L. et Lilenbaum W. (2010, Brésil) ont montré une diminution de la sensibilité du test IFN $\gamma$  réalisé entre 7 (74,3 %) et 21 jours (71,4 %) après l'IDC.

Thom M.L. et ses collègues (GB, 2006) ont également remarqué, chez des veaux expérimentalement infectés, que seules les réponses en IFN $\gamma$  aux PPDA augmentaient rapidement 7 jours après l'IDC. Cet effet « booster » sélectif de la réponse à PPDA peut masquer le diagnostic de l'infection par le test Bovigam<sup>®</sup> (De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Par ailleurs, Lauzi S. et ses collègues (Italie, 2000) ont montré l'absence d'effet « booster » de l'IDC sur l'analyse d'IFN $\gamma$  réalisée sur des animaux indemnes. En effet, ils ont obtenu une spécificité du test Bovigam<sup>®</sup> de 88,8 % lorsque la prise de sang pour l'analyse (IFN $\gamma$ 1) est réalisée juste avant l'IDC. Puis, une seconde analyse IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$ 2) est réalisée moins de 60 jours après l'IDC (et l'IFN $\gamma$ 1) sur les animaux positifs ou douteux en IFN $\gamma$ 1 (11,2 %). Seulement 0,5 % des animaux restent positifs à l'IFN $\gamma$ 2 (spécificité d'IFN $\gamma$ 2 à 95,4 %).

Au contraire, Marassi C.D., Medeiros L. et Lilenbaum W. (2010) ont montré une diminution de la spécificité du test IFN $\gamma$  réalisé entre 7 jours (86,7 %) et 21 jours (80 %) après l'IDC.

En résumé, l'IDS (au pli sous-caudal) peut « booster » les réponses en IFN $\gamma$  chez des animaux infectés par *M. bovis*. De plus, la prise de sang pour le test IFN $\gamma$  peut être réalisée 3 jours après l'application de l'IDS sans compromettre le résultat du test. *A contrario*, l'IDC ne semble pas stimuler de manière significative cette production en IFN $\gamma$  chez des animaux

naturellement infectés. Néanmoins, des résultats contradictoires ont été présentés par d'autres auteurs, dans le cas d'animaux expérimentalement infectés. En effet, les auteurs suggèrent de réaliser le test IFN $\gamma$  dans les 7 jours suivants l'IDC (Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005 ; De la Rúa Domenech R. *et al.*, 2006a).

En outre, selon certains auteurs, l'analyse IFN $\gamma$  chez le bétail ne serait pas influencée par des applications multiples d'IDT. Cependant, ces injections répétées de tuberculines mèneraient à une désensibilisation des animaux naturellement infectés (Thom M. *et al.*, 2004 ; Rangen S.A. *et al.*, 2009 ; Coad M. *et al.*, 2010 ; Schiller I. *et al.*, 2010 ).

Enfin, aucun effet « booster » des IDT n'a été mis en évidence chez des animaux indemnes.

#### III.2.1.2.4.3. Utilisation d'Ag immunodominants : ESAT6/CFP10

Les Ag spécifiques tels ESAT6 et CFP10 sont désormais régulièrement employés pour le test IFN $\gamma$ . Utilisés à la place des PPD, ils permettent d'augmenter la spécificité du test (mais diminuent la sensibilité) et s'avèrent donc utiles dans le contexte de réactions non spécifiques en réponses aux PPD (Tableau I.1.4) (Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Andersen P. *et al.*, 2000 ; Pollock J.M. *et al.*, 2000 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000b ; Buddle B.M. *et al.*, 2001 et 2003 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Aagaard C. *et al.*, 2006 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

De plus, l'utilisation des Ag ESAT6 et CFP10 pour le test IFN $\gamma$  permet de discriminer *in vitro* les animaux vaccinés par *M. bovis* BCG, des animaux infectés par *M. bovis* (Buddle B.M. *et al.*, 1999 et 2001 ; Van Pinxteren L.A.H. *et al.*, 2000 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2001 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

En effet, l'Ag ESAT6 (identifié par Andersen A.B. *et al.*, 1995 et caractérisé par Sorrensen A.L. *et al.*, 1995) et l'Ag CFP10 (identifié par Berthet F.X. *et al.*, 1998) sont codés par des gènes présents dans le génome de *M. bovis* et *M. tuberculosis*, mais absent du génome de *M. bovis* BCG et de la plupart des mycobactéries environnementales (Harboe M. *et al.*, 1996 ; Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a). Ainsi, des séquences homologues à ESAT6 et CFP10 ont été définies pour *M. kansasii*, *M. marinum* et *M. szulgai* (Sorrensen A.L. *et al.*, 1995 ; Harboe M. *et al.*, 1996 ; Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Andersen P. *et al.*, 2000) ainsi que récemment *M. ryadhense* (Van Ingen J. *et al.*, 2009ab).

ESAT6 et CFP10 ont été identifiés comme des cibles majeures des LT d'animaux infectés par *M. bovis* et donc comme des Ag immunodominants pour stimuler *in vitro* les réponses en

IFN $\gamma$  (Ag prédominants au début de l'infection) (Andersen A.B. *et al.*, 1995 ; Harboe M. *et al.*, 1996 ; Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000ab ; Buddle B.M. *et al.*, 2001).

Ces Ag immunodominants sont utilisés sous forme de protéines recombinantes (Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Buddle B.M. *et al.*, 1999 et 2003 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000b ; Pollock J.M. *et al.*, 2000 et 2003 ; Van Pinxteren L.A.H. *et al.*, 2000 ; Waters W.R. *et al.*, 2004 ; Olsen I. *et al.*, 2005 ; Aggerbeck H. et Madsen S.M., 2006 ; Aagaard C. *et al.*, 2006 ; Weldingh K. et Andersen P., 2008) ou de peptides de synthèse (Vordermeier H.M. *et al.*, 2001 et 2006a ; Buddle B.M. *et al.*, 2003 ; Cockle P.J. *et al.*, 2006 ; Coad M. *et al.*, 2008).

Selon Pollock J.M. et Andersen P. en 1997, l'utilisation d'ESAT6 peut permettre aussi d'abaisser les seuils de positivité du test IFN $\gamma$  pour augmenter la sensibilité par rapport aux PPD et garder un niveau acceptable de spécificité.

En outre, Van Pinxteren L.A.H. (2000), Vordermeier H.M. (2001 et 2006ab), Buddle B.M. (2003), Cockle P.J. [2006, (*utilisation d'Ag immunodominants spécifiques supplémentaires*)], Aagaard C. (2006), Coad M. (2008) et leurs collaborateurs respectifs ont démontré que l'utilisation en mélange des Ag ESAT6 et CFP10 permettait d'améliorer (d'autant plus qu'en individuel) la spécificité de l'immunodiagnostic *in vitro* de la Tb (Tableau I.1.4). Waters W.R. et ses collègues (2004) ont également montré qu'une protéine recombinante, issue de la fusion entre ESAT6 et CFP10, n'induit pas de réponse en IFN $\gamma$  pour des animaux sensibilisés par *M. avium* ou par *M. avium* subsp. *paratuberculosis* alors que les PPD entraînent des réactions (faussement positives) pour ces animaux. Par contre, cette protéine recombinante induit une réponse égale à celle induite par les PPD chez des bovins infectés par *M. bovis*.

De plus, les résultats des travaux d'Ewer K. exposés par Coad M. et ses collègues (2008) ont montré que l'inclusion du cocktail ESAT6-CFP10 (mix) au test IFN $\gamma$  conventionnel (Bovigam<sup>®</sup>) permettait d'augmenter sa sensibilité (estimée à partir des résultats positifs en PPD ou mix) ou sa spécificité (évaluée à partir des résultats négatifs en PPD et mix).

Toutefois, dans le cas d'infection par *M. kansasii* [Waters W.R. *et al.*, 2006 (EUA) ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2007 (GB) ; Buddle B.M., Livingstone P.G. et De Lisle G.W., 2009 (NZ) ; Houlihan M. *et al.*, 2010 (GB)] ou *M. marinum* ou *M. szulgai*, des réponses *in vitro* à ESAT6 et/ou CFP10 peuvent être confondues avec des réactions observées dans le cas d'infection à *M. bovis*. Ce test ne permet donc pas de distinguer une infection à *M. bovis* d'une sensibilisation à une de ces mycobactéries atypiques.

Par ailleurs, des réactions non-spécifiques à certains Ag spécifiques du MTBC comme ESAT6, observées chez des jeunes animaux indemnes ont été rapportées dans les travaux d'Olsen I. et ses collaborateurs (2005). Ceci est probablement le résultat d'une production innée d'IFN $\gamma$  par les cellules NK du sang périphérique stimulées *in vitro* par ces Ag (Olsen I. *et al.*, 2005 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

**Tableau I.1.4.** Résultats exposés par plusieurs auteurs, concernant des études de sensibilité (Se) et /ou de spécificité (Sp), obtenus pour le test IFN $\gamma$  basé sur PPD, sur ESAT6 et CFP10 (en individuel et en mélange), puis sur PPD et mélange peptidique.

Test IFN $\gamma$ basé sur ...	PPD		ESAT6		CFP10		ESAT6 & CFP10 en Mélange		PPD et Mélange (ESAT6 & CFP10)	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
Pollock J.M. <i>et al.</i> , 2000	89,3	92,2	76,3	<b>99,2</b>	–	–	–	–	–	–
Vordermeier H.M. <i>et al.</i> , 2001	–	–	–	–	–	–	77,9	<b>100</b>	–	–
Buddle B.M. <i>et al.</i> , 2001	<b>94</b>	94	84	<b>100</b>	–	–	–	–	–	–
Buddle B.M. <i>et al.</i> , 2003 et 2009	95	74	–	–	–	–	89	<b>93</b>	–	–
Aagaard C. <i>et al.</i> , 2006	–	–	69	<b>91</b>	68	<b>94</b>	85	<b>97</b>	–	–
Vordermeier M. et Ewer K., 2006	–	96,7	–	–	–	–	–	<b>97,0</b>	–	<b>94,6*</b> <b>99,2**</b>
Cockle P.J. <i>et al.</i> , 2006	84,5	93	–	–	–	–	91,4	<b>98</b>	–	–
Coad M. <i>et al.</i> , 2008 (données Ewer K.)	65	85,7	–	–	–	–	55	94,2	<b>70*</b> <b>50**</b>	<b>81,2*</b> <b>98,7**</b>

\* Résultats PPD ou mélange peptidique (ESAT6 & CFP10 soit (R)) : PPDUR ; \*\* : Résultats PPD et ESAT6 & CFP10 (R) : PPD $\cap$ R; – : pas de données.

Pour conclure, même si ESAT6 et CFP10 sont régulièrement utilisés, des études à large échelle concernant ces Ag font encore défaut.

D'après l'étude de Pollock J.M. et ses collègues réalisée en 2003 à partir de bovins infectés par *M. bovis* et de bovins sensibilisés par des mycobactéries environnementales, ESAT6 (avec une dose plus élevée que celle des PPD) peut induire *in vivo* des réactions de type HSR chez des bovins infectés par *M. bovis*. Ces auteurs ont obtenu une meilleure sensibilité pour l'IDT basée sur les PPD (86 % avec PPD et 82 % avec ESAT6) mais une meilleure spécificité pour l'IDT basée sur l'ESAT6 (100 % avec ESAT6 et 90 % avec PPD). Van Pinxteren

L.A.H. et ses collègues ont obtenu des résultats semblables en 2000 (utilisation des Ag ESAT6 et CFP10 en mélange).

### III.2.2. La technique PCR en temps réel pour le diagnostic *post mortem*

La technique PCR est une méthode d'amplification de l'ADN *in vitro* (Cf. Annexe VIII) permettant la détection de quelques bactéries à partir d'un échantillon biologique.

Elle présente un intérêt fondamental dans le domaine du diagnostic de la Tb car elle est beaucoup plus rapide que la bactériologie (résultats rendus 48 heures/ plusieurs mois). De plus, elle s'avère très utile et efficace lorsque les prélèvements ont été contaminés par la flore de l'environnement et qu'ils sont inutilisables en culture. En effet, cette technique a servi à la détection de nombreux organismes qui étaient difficilement détectables par les méthodes conventionnelles (Erlich H.A. *et al.*, 1991). Par ailleurs, comme nous l'avons décrit précédemment, la PCR permet également, d'identifier plus rapidement (que les tests enzymatiques) les souches isolées sur milieu de culture (González Llamazares O.R. *et al.*, 1999a).

L'inconvénient de la PCR est qu'elle évalue la présence d'ADN et cela ne donne donc pas d'information sur la viabilité des agents détectés.

#### III.2.2.1. La PCR pour la recherche de Tb d'après la littérature

La littérature montre que la méthode PCR est largement employée pour détecter les membres de MTBC directement dans les tissus animaux (Corner L.A., 1994 ; Liébana E. *et al.*, 1995 ; Wards B.J., Collins D.M. et De Lisle G.W., 1995 ; De Araujo C.P., *et al.*, 2005 ; Zumárraga M.J. *et al.*, 2005 ; Hénault S., Karoui C. et Boschiroli M.L., 2006 ; Shitaye J.E., *et al.*, 2006 ; Taylor G.M. *et al.*, 2007 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007 ; Parra A. *et al.*, 2008). Néanmoins, la spécificité et la sensibilité du test PCR reposent tout d'abord sur le choix de la cible puis, sur la qualité d'hybridation des amorces et de la sonde (pour les tests PCR basés sur des sondes) avec la séquence sur l'ADN cible.

##### III.2.2.1.1. Différentes cibles génétiques spécifiques du MTBC

Les cibles génétiques utilisées en PCR pour la détection des bactéries du MTBC sont très nombreuses.

➤ Le gène *mpb-70*, responsable de la production de la protéine sécrétée MPB70, est considéré comme une cible spécifique et quantifiable (une seule copie dans tous les membres du MTBC) pour la détection moléculaire du MTBC (Cousins D., Wilton S. et Francis B., 1991 ; Kusomoki S. *et al.*, 1992 ; Gonzáles Llamazares O.R.*et al.*, en 1999a ; Young J.S., Gormley E. et Wellington E.M.H., 2005).

De même, MPB64 est une autre protéine sécrétée, codée par le gène *mpb-64* qui est présent dans les membres du MTBC et chez *M. kansasii* (Hugues M.S. *et al.*, 2005).

➤ De plus, le gène **Rv0577** également désigné *Cfp-32*, codant pour une protéine de 32 kDa du filtrat de culture, est strictement présent dans toutes les bactéries du MTBC (Huard R.C. *et al.*, 2003 a et b et 2006) ;

➤ Les éléments ADN mobiles répétés sont profusément utilisés comme séquences cibles des sondes ADN. Leurs applications concernent le diagnostic des maladies dues aux mycobactéries mais aussi l'épidémiologie des maladies infectieuses (Dziadek J. *et al.*, 1998).

Parmi les éléments répétés, les séquences d'insertion (IS) des mycobactéries sont souvent utilisées comme cibles pour la méthode PCR, comme le mentionne la littérature renvoyant à cette thématique. Quelques-unes des IS les plus connues et utilisées sont décrites ci-après.

- L'**IS1081** est une séquence amplement utilisée. Elle a été identifiée au nombre de 6 copies dans le génome de *M. bovis* par Collins D.M. et Stephens D.M. en 1991. Cet élément multi-copie est aussi exclusivement présent dans toutes les espèces du MTBC (Van Soolingen D. *et al.*, 1992; Taylor G.M. *et al.*, 2007). Ce n'est donc pas un marqueur épidémiologique satisfaisant puisqu'il présente un nombre de copies homogène entre les espèces (Dziadek J. *et al.*, 1998, 2000 et 2001). Selon Collins D.M. et Stephens D.M. en 1991 et Taylor G.M. *et al.* en 2007, la PCR *IS1081* est une bonne candidate pour détecter en routine des infections dues à *M. bovis* ou d'autres bactéries du MTBC à partir de nœuds lymphatiques ou d'autres tissus.

- L'**IS990**, caractérisée par Dziadek J. *et al.* en 1998, est également spécifique de MTBC, mais il ne semble être pas un bon marqueur puisqu'il porte deux mutations avec décalage du cadre de lecture. Néanmoins, selon Dziadek J., Sajduda A. et Borun M. en 2001, les éléments *IS1081* et *IS990* associés (multi-cibles ou duplex) peuvent constituer une alternative efficace à l'*IS6110* pour le diagnostic de la tuberculose dans des échantillons cliniques humains.

- L'**IS1607** est présente en une seule copie dans les souches de *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. bovis* BCG. A la suite d'une étude réalisée en 2000, Dziadek J. et ses collègues ont pu conclure que l'**IS1607** semblait spécifique de MTBC. Néanmoins, cet IS est très peu décrite dans la littérature.

- L'**IS6110**, initialement isolée de *M. tuberculosis* par Thierry D. et ses collaborateurs en 1990, est retrouvée exclusivement dans le génome de tous les membres de MTBC (Thierry D. *et al.*, 1990 ab; McEvoy C.R.E. *et al.*, 2007). La différence de position et de nombre de copies d'IS est une source de polymorphisme (Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a). La plupart des isolats de *M. bovis* découverts, a révélé que son génome comprend généralement moins de 5 copies d'**IS6110** et le plus souvent une seule copie (Van Soolingen D. *et al.*, 1991 et 1994 ; Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a ; Zumárraga M.J. *et al.*, 2005).

Actuellement, l'**IS6110** est l'un des marqueurs les plus utilisés en PCR pour le diagnostic de la Tb. En 1995, Liébana E. et ses collègues ont conclu que l'**IS6110** permettait la détection par PCR des mycobactéries du MTBC, à partir d'échantillons de tissus bovins, même lorsque des mycobactéries à croissance rapide sont également présentes dans l'échantillon (source de contamination en culture) ou bien même si *M. bovis* est non-revivifiable (non-cultivable). En 1998, Vitale F. et ses collaborateurs ont montré que la PCR ciblée **IS6110** permettait une détection de MTBC chez les bovins à partir du lait, de nœuds lymphatiques et d'écouvillons nasaux. Néanmoins, ils ont obtenu une sensibilité de cette PCR nettement meilleure pour les échantillons de lait et ganglions (100 %) que pour les écouvillons nasaux (58 %).

Enfin, l'**IS986** est un membre de la famille des IS3. Identifiée en 1989 par Zainuddin Z.F. et Dale J.W., elle a été ensuite séquencée en 1990 par McAdam R.A. et ses associés qui ont conclu qu'elle était virtuellement identique à l'**IS6110**. Cette même année, les travaux de Hermans P.W.M. et ses collègues ont montré que l'**IS986** était un outil extrêmement utile pour le diagnostic et l'épidémiologie de la tuberculose.

#### III.2.2.1.2. Différentes cibles génétiques spécifiques de *M. bovis*

La méthode pour la détection directe de *M. bovis* ou MTBC par PCR, dans des échantillons de tissus bovins, a été développée pour améliorer le diagnostic de la Tb (Zumárraga M.J. *et al.*, 2005 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007).



En 1997, Fisanotti J.C. et ses collègues ont montré qu'une séquence flanquante du gène *mpb-64* présentait une homologie différentielle de séquences entre *M. bovis* et *M. tuberculosis* et par conséquent, qu'elle pourrait être employée comme cible d'un test PCR d'identification d'espèce.

Par ailleurs, en 1999, Zumárraga M. et ses collaborateurs ont découvert après une analyse de séquence des génomes de *M. tuberculosis* et *M. bovis*, l'absence chez *M. bovis* d'un fragment de 12,7 kb présent chez *M. tuberculosis*. Ce fragment de 12,7 kb est donc un marqueur pour différencier *M. bovis* de *M. tuberculosis*, qui peut être utilisé comme cible d'un test PCR (Zumárraga M. *et al.*, 1999 ; Bakshi C.S. *et al.*, 2005).

Enfin, en 2004, Kurabachew M. et ses collègues ont développé et évalué un test PCR (classique) multiplex, basé sur trois cibles – l'ADNr 16S spécifique du genre *Mycobacterium*, l'ADNr 23S spécifiques des espèces du MTBC et le gène *oxyR* de *M. bovis* (basée sur une différence nucléotidique par rapport aux autres espèces du MTBC) – permettant de détecter simultanément *Mycobacterium*, le MTBC et de différencier *M. bovis* des autres espèces du MTBC.

#### III.2.2.2. La méthode PCR IS6110 en temps réel de LSI (étudiée dans ce travail)

Spécifique, sensible et stable, la séquence IS6110 possède donc toutes les qualités requises pour le développement d'un test rapide de diagnostic par PCR à partir de prélèvements biologiques.

De plus, étant donné l'efficacité de la séquence d'insertion IS6110 en tant que cible PCR pour l'identification de MTBC dans les tissus (notamment démontrée en France pour la faune sauvage, par Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006), elle a été choisie par le LDAR 24 et proposée à la société LSI (Laboratoire Service International) afin de concevoir un test PCR en temps réel, utilisable en santé animale, pour la recherche rapide des espèces bactériennes du MTBC.

Un test PCR en temps réel a donc été développé, le kit TaqVet<sup>®</sup> MTBC basé sur un système de détection de l'IS6110 par une sonde Taqman<sup>®</sup> spécifique, à partir d'ADN extrait de tissus animaux.

##### III.2.2.2.1. Présentation du test PCR MTBC de LSI (1<sup>ère</sup> version, 2007)

Le test PCR spécifique du MTBC conçu par LSI pour la recherche de la Tb est un système en duplex, c'est-à-dire qu'il présente deux cibles génétiques : l'une est l'IS6110 (MTBC) et

l'autre est un contrôle positif interne, pour l'extraction et l'amplification, appelé IPC (*Internal positive control*) (Cf. Annexe IX).

Le mix réactionnel PCR (1<sup>ère</sup> version du kit) appelé « mix » (auquel l'échantillon ou les témoins à analyser sont ajoutés) comprend du « Master mix » (*Taq polymérase, de dNTPs et de tampons aqueux*) pour PCR basée sur un système Taqman<sup>®</sup> (Applied Biosystem, EUA) et, un mélange de séquences spécifiques du fragment d'IS6110 recherché (*sonde Taqman<sup>®</sup> et amorces*) et de séquences spécifiques d'un IPC endogène (*sonde Taqman<sup>®</sup> et amorces*).

L'amplification et la détection des cibles IS6110 et « IPC endogène » s'effectuent donc dans la même cupule. Ainsi, deux cibles sont recherchées par puits (monocupule) (Cf. Annexe IX).

Par ailleurs, cet IPC est qualifié d'endogène (IPC<sub>endo</sub>) car il s'agit d'une séquence codant pour la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) des ruminants qui est une protéine membranaire présente dans les tissus des ruminants. Il est extrait en même temps que l'IS6110 à partir de l'échantillon biologique. L'utilisation de cet IPC<sub>endo</sub> permet ainsi de garantir à la fois l'efficacité de l'extraction et de l'amplification et l'absence d'inhibiteur dans les échantillons extraits.

Des témoins d'extraction et d'amplification sont également utilisés. Un témoin d'extraction négatif pour les deux cibles, nommé NCS (*Negatif Control Sample*) est employé. Il s'agit simplement de PBS qui est préalablement extrait comme un échantillon. Les résultats d'amplification du NCS permettent de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) et/ou l'IPC<sub>endo</sub> lors de l'extraction.

Un témoin d'amplification négatif pour les deux cibles, appelé NC (*Negative Control*) est également utilisé. Il s'agit uniquement de « mix ». Les résultats permettent de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) et/ou l'IPC<sub>endo</sub> lors des étapes de préparation des Mix et de dépôt des échantillons.

Enfin, un témoin d'amplification positif pour la cible IS6110, nommé EPC (*External Positive Control*) est inclus dans le kit. Cet EPC est de l'ADN extrait de *M. bovis*. Les résultats d'amplification permettent de vérifier l'efficacité de l'amplification par PCR de l'IS6110.

La validation de l'analyse PCR par ces trois témoins (NC, EPC et NCS) est réalisée en vérifiant si les valeurs de cycle seuil (Ct) obtenues pour chaque témoin, sont en accord avec les valeurs de contrôle qualité du kit, données par le fournisseur. En effet, l'EPC doit être positif seulement pour la cible IS6110, c'est-à-dire la valeur de Ct obtenue pour l'EPC doit

être comprise entre 25 et 28 avec le détecteur IS6110 et supérieure à 40 avec le détecteur IPC<sub>endo</sub>. Enfin, le NC et le NCS doivent être chacun négatifs pour les deux cibles. Ainsi, la valeur de Ct obtenue pour le NC doit être supérieure à 45 avec les détecteurs IS6110 et IPC<sub>endo</sub>. La valeur de Ct obtenue pour le NCS doit être également supérieure à 40 avec les détecteurs IS6110 et IPC<sub>endo</sub>.

Après la validation de l'analyse PCR par les témoins, les résultats des échantillons peuvent être interprétés en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IS6110 et IPC<sub>endo</sub> (Tableau I.1.5).

**Tableau I.1.5.** Interprétation des résultats des échantillons analysés avec la 1<sup>ère</sup> version de la méthode PCR IS6110 étudiée, en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IS6110 (Ct IS6110) et IPC<sub>endo</sub> (Ct IPC<sub>endo</sub>).

Interprétation des résultats de l'échantillon	Valeur du Ct IS6110 obtenue pour l'échantillon	Valeur du Ct IPC <sub>endo</sub> obtenue pour l'échantillon
<b>MTBC Positif</b>	≤ 40 (a)	≤ 40 ou > 40
<b>MTBC Négatif</b>	> 40	≤ 40
<b>Invalide</b>	> 40	> 40 (b)

**Légende :**

(a) Pour des échantillons de même nature, plus la valeur de Ct IS6110 est faible, plus la charge bactérienne contenue dans l'échantillon est importante.

(b) Dans le cas de résultat invalide (en raison de la présence d'inhibiteurs,...), il est nécessaire de diluer l'échantillon au 1/10 (par exemple 10 µl d'ADN dans 90 µl d'eau) et recommencer la PCR. Pour l'interprétation, la valeur du Ct IPC<sub>endo</sub> obtenue doit être inférieure ou égale à 43 (40+3, le fait de diluer l'échantillon au 1/10, on doit ajouter théoriquement 3,3 unités de Ct à 40).

Néanmoins, un système d'interprétation des résultats des échantillons plus précis (inclusion d'une zone douteuse) serait nécessaire. Pour établir ce mode d'interprétation, il faudrait avoir déterminé la limite de détection de ce test PCR. Par ailleurs, la sensibilité et la spécificité analytique du test devraient être vérifiées. De même, il faudrait connaître les performances du test utilisé sur le terrain (valeur opérationnelle).

#### III.2.2.2.2. Conditions de réalisation du test

Ce test a été conçu en vue d'une utilisation directe à partir de ganglions ou organes d'animaux mais il peut être aussi utilisé indirectement, pour l'identification de colonies isolées. Dans les deux cas, une étape préalable d'extraction d'ADN présent dans l'échantillon est requise.