

**EXPERIMENTATION VISANT A COMPARER LE NIVEAU D'INNOCUITE
DU VACCIN REV.1 CONJONCTIVAL CHEZ LE BOUQUETIN DES ALPES
(CAPRA IBEX) ET LA CHEVRE DOMESTIQUE (CAPRA HIRCUS)**

RAPPORT FINAL (22 JUILLET 2017)

**PONSART C^{1.}, RIOU M.^{2.}, LOCATELLI Y.^{3.}, FADEAU A.^{4.}, JAY M.^{1.}, JACQUES I.^{2.},
SIMON R.^{3.}, PERROT L.^{1.}, BRETON S.^{2.}, HAUMEUIL T.^{2.}, BLANC B.^{3.}, ORTIZ K.^{3.}, RIOULT
D.^{5.}, QUEMERE E.^{6.}, SARRADIN P.^{2.}, , CHOLLET J.-Y.^{7.},
GARIN-BASTUJI B.^{8.}, ROSSI S.^{7.}**



(photo : Roland Simon, Parc de la Haute Touche, MNHN)

- 1 Unité Zoonoses Bactériennes, LSAAn, Anses Maisons-Alfort
- 2 Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE), Inra centre Val de Loire, Nouzilly
- 3 Réserve Zoologique de la Haute Touche, MNHN, Obterre
- 4 Service MAP, Laboratoire de Touraine, conseil départemental d'Indre-et-Loire, Tours
- 5 Unité stress environnementaux et biosurveillance des milieux aquatiques, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims
- 6 Unité comportement et écologie de la faune sauvage CEFS, Inra, Castanet-Tolosan
- 7 Unité sanitaire de la Faune, DRE, ONCFS, St Benoist
- 8 Direction des affaires européennes et internationales, Anses, Maisons-Alfort

REMERCIEMENTS

Les auteurs de ce rapport tiennent à remercier les personnels techniques, administratifs et encadrant du MNHN, de l'INRA, de l'Anses, de l'ONCFS et du laboratoire vétérinaire de la Touraine pour leur participation à ce délicat travail collectif réalisé dans un temps extrêmement contraint. Des remerciements sont adressés à la communauté des parcs zoologiques, et plus particulièrement à la Réserve zoologique de la Haute Touche (Obterre, 36), au parc des Angles (Les Angles, 66), au domaine de Pescheray (Le Breil-sur-Mérize, 72) pour le don de bouquetins des Alpes (*Capra ibex*) et le temps de travail qu'ils ont concédé à cette étude et sans qui rien n'aurait été possible. Bien sûr les auteurs remercient pour leur examen attentif et efficace des demandes d'autorisation de projets relatives à cette expérimentation le comité d'éthique du Val de Loire (Inra), le comité d'éthique Cuvier (MNHN) et le ministère chargé de la recherche. Enfin, des remerciements sont adressés aux deux ministères chargés de l'agriculture et de l'écologie, les deux maîtres d'ouvrages, qui ont cofinancé et encouragé ce travail scientifique en appui à la gestion d'un foyer sauvage de brucellose chez une espèce protégée.

TABLE DES MATIERES

1. RESUME	5
2. INTRODUCTION.....	8
2.1. Contexte du foyer de brucellose du Bargy et de la saisine interministérielle	8
2.2. Historique de la vaccination à l'aide de la souche Rev.1	9
2.3. Objectifs de l'étude	11
3. MATERIELS ET METHODES	13
3.1. Constitution des lots et conditions d'hébergement	13
3.1.1. Bouquetins	13
3.1.2. Chèvres	14
3.2. Génotypage des bouquetins en lien avec la résistance naturelle à la brucellose	16
3.3. Procédures appliquées aux animaux.....	16
3.3.1. Calendrier	16
3.3.2. Prélèvements sur animaux vivants	17
3.3.3. Prélèvements sur animaux morts	17
3.3.4. Ethique du projet	18
3.4. Tests de laboratoire	22
3.4.1. Tests sérologiques	22
3.4.2. Examens bactériologiques	22
3.4.3. Contrôle du lot de vaccin	23
3.5. Suivis cliniques.....	24
3.5.1. Numération sanguine	24
3.5.2. Capacité oxydative des globules blancs (ROS)	25
3.5.3. Suivis comportementaux	26
3.6. Analyses statistiques	26
3.6.1. Distribution de la souche vaccinale au niveau individuel.....	26
3.6.2. Charge bactérienne au niveau des organes infectés.....	26
3.6.3. Profils sérologiques après vaccination	28
4. RESULTATS	29
4.1. Vérification des vaccins	29
4.2. Suivis cliniques et sanitaires	29
4.2.1. Signes clinique et lésions	29
4.2.2. Numération sanguine	30
4.2.3. mesure des ROS.....	32
4.2.4. Suivis hormonaux.....	33
4.3. Résultats sérologiques (immunité humorale = production d'anticorps)	34
4.3.1. Résultats qualitatifs observés au niveau de l'ensemble des animaux	34
4.3.1. Approche comparative quantitative	35
4.4. Analyses bactériologiques.....	37
4.4.1. Résultats observés sur l'ensemble des animaux	37
4.4.2. Proportion d'organes infectés à l'échelle des individus vaccinés	37
4.4.3. Charge bactérienne à l'échelle des organes infectés	42
5. DISCUSSION.....	44
5.1. Interprétation des résultats de l'expérimentation	44
5.1.1. Cohérence du modèle domestique (Chèvre) avec la littérature	45
5.1.2. Réponse au vaccin du Bouquetin des Alpes et différences interspécifiques	46
5.2. Conséquence pour l'utilisation du vaccin en nature	49
5.2.1. Conséquence pour la gestion/surveillance du foyer sauvage du Bargy	49
5.2.2. Risque associé à la vaccination pour l'Homme et le cheptel domestique	51
6. CONCLUSION GENERALE	52
7. REFERENCES	53
8. ANNEXES	56
8.1. Courrier interministériel du 26 septembre 2016	56
8.2. Convention du consortium	56

1. RESUME

Ce travail se situe dans le contexte exceptionnel du foyer sauvage de brucellose chez les bouquetins du Bargy, associé à deux cas humains et un foyer bovin de la même zone. Une expertise collective pilotée par l'Anses en 2014-2015 suggère la vaccination des bouquetins comme une piste sérieuse de gestion, en complément d'abattages ciblés et/ou massifs. En 2016, après examen de la littérature, un panel d'experts (co-piloté par l'Anses et l'ONCFS) recommandait que le critère d'innocuité du vaccin Rev.1 chez le bouquetin soit étudié. Sur la base de ces expertises, les ministères chargés de l'agriculture et de l'environnement ont demandé à un consortium de quatre établissements publics (Anses, Inra, MNHN, ONCFS) de conduire une expérimentation visant à comparer le niveau d'innocuité du vaccin Rev.1 conjonctival chez le Bouquetin des Alpes (*Capra ibex*) et la Chèvre domestique (*Capra hircus*).

Cette étude s'est focalisée sur la comparaison interspécifique de la distribution de la souche vaccinale, de son excrétion et de la réponse immunitaire humorale. Pour des raisons réglementaires, techniques et éthiques précédemment développées lors de l'Appui Scientifique et Technique de 2016, il n'a pas été possible de réaliser un test d'innocuité clinique chez des femelles gestantes, ni un test d'efficacité vaccinale, nécessitant la réalisation d'un challenge infectieux. En effet, de tels tests supposeraient la disponibilité d'un environnement hautement confiné, adapté au bien-être des bouquetins et aux forts risques d'avortement brucellique et d'excrétion associée. L'étude a été conduite au sein de deux établissements agréés pour l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques : le Parc zoologique de la Haute Touche (MNHN) pour les bouquetins (janvier-avril 2017) et la plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE) du centre Inra du Val de Loire pour les chèvres (février-mai 2017). En tout, 24 animaux (12 bouquetins et 12 chèvres) ont été inclus dans cette étude, répartis en quatre lots de six mâles et six femelles de chaque espèce (sexuellement matures et non gestantes), chaque lot étant hébergé séparément (aucun contact direct, ni indirect entre lots). Au sein de chaque lot, quatre à cinq animaux ont été vaccinés par voie conjonctivale à l'aide du vaccin Rev.1, tandis qu'un ou deux animaux contacts ont été momentanément séparés (3 h-24 h) avant d'être remis en contact avec leurs congénères vaccinés de même sexe. La moitié des individus a fait l'objet d'une euthanasie et a été autopsiée à J45, puis l'autre moitié à J90 post vaccination ; au moins un animal contact par lot est resté vivant en compagnie de deux ou trois congénères vaccinés et ce, jusqu'au terme de l'expérimentation (J90). Des prélèvements intermédiaires incluant prises de sang et écouvillons ont permis de compléter l'étude de la cinétique sérologique et bactérienne à J20 et J68 post-vaccination. Chez les animaux autopsiés, des cultures bactériennes ont été conduites sur huit organes ou nœuds lymphatiques (NL) représentatifs d'une colonisation par la souche vaccinale, au niveau locorégional (tête) ou urogénital (associé au risque d'excrétion). La cinétique des anticorps, des cellules blanches et d'un indicateur de stress a également été étudiée en parallèle des examens bactériologiques.

Les résultats de cette étude sont concluants dans la mesure où tous les animaux vaccinés ont séroconverti et ont montré un résultat positif en culture bactérienne au niveau locorégional, comme cela est attendu lors d'une vaccination réussie. Par ailleurs, aucun des animaux vaccinés n'a développé de lésions ni de signes cliniques

imputables à la souche vaccinale (contexte hors gestation et avortement brucellique). Néanmoins, on observe une réaction immunitaire humorale (production d'anticorps spécifiques) et une distribution de la souche vaccinale très contrastée entre les deux espèces.

La proportion d'organes infectés, en particulier au niveau urogénital, était beaucoup plus élevée chez les bouquetins que chez les caprins domestiques. Au sein des bouquetins mâles vaccinés, une excrétion urogénitale a été détectée à J20 et J45 chez deux animaux sur cinq ; une telle excrétion n'a pas été observée dans les autres lots de chèvres ou de bouquetins femelles (non gestantes). On a par ailleurs pu constater la transmission de la souche vaccinale au mâle contact, lequel a séroconverti entre J45 et J68, transmission à mettre très probablement en rapport avec l'excrétion urogénitale chez deux mâles vaccinés mentionnée précédemment. Lors de son autopsie à J90, ce mâle contact présentait la même distribution et charge bactérienne que les bouquetins mâles vaccinés à J45 post-vaccination. Au sein des organes infectés, la charge bactérienne à J45 était très supérieure chez les bouquetins en comparaison des chèvres, tandis qu'à J90 les charges étaient modérées à faibles dans les deux espèces, avec une nette variabilité inter-individus notamment dans l'espèce Bouquetin (pas de différence statistique mise en évidence entre espèces à J90). Dans cette expérimentation, bien que des variations individuelles demeurent, l'effet de l'espèce sur la distribution de la souche vaccinale apparaît majeur en comparaison d'effets individuels peu ou pas significatifs (âge, sexe, génétique, état clinique). La proportion d'organes infectés diminue significativement entre J45 et J90, et plus aucune excrétion n'est observée à J90, comme cela est habituellement le cas dans le cadre d'une vaccination réussie (tendance à la rétrocession de la souche vaccinale) ; néanmoins, bien que cette tendance soit encourageante, on constate à J90 une persistance de la souche vaccinale dans les NL de la sphère urogénitale, associée à des charges modérées à faibles chez trois bouquetins sur quatre et chez deux chèvres sur quatre. Ces résultats diffèrent du modèle ovin domestique chez lequel la souche vaccinale n'envahit pas la sphère urogénitale des mâles ou des femelles non gestantes et disparaît des organes avant J90. Sur la base de ces résultats, si nous sommes en mesure de pointer les différences entre espèces au cours des 3 mois suivant la vaccination, il nous est en revanche difficiles de conclure définitivement quant aux possibilités d'élimination ou de persistance et de ré-excrétion ultérieure de la souche vaccinale chez le Bouquetin.

Au plan de la cinétique des cellules blanches (augmentation de la production de lymphocytes au détriment des neutrophiles) et de la production d'anticorps spécifiques, on observe une réaction immunitaire plus tardive, plus intense et durable chez les bouquetins en comparaison des chèvres domestiques. En dépit d'une réponse immunitaire en apparence plus forte, le Bouquetin est beaucoup moins efficace que la Chèvre à contenir la multiplication de cette souche bactérienne intracellulaire (vis-à-vis de laquelle les anticorps sont probablement inefficaces). Nous émettons l'hypothèse du caractère « naïf » de la réponse immunitaire de cette espèce sauvage, ce qui est peut-être à mettre en rapport avec le fait que, contrairement aux espèces domestiques, cette espèce sauvage n'a pas co-évolué avec la brucellose.

Pour conclure, au vu de ces résultats, il apparaît que la distribution de la souche Rev.1, le risque d'excrétion et la réponse immunitaire humorale associés à la vaccination, testés selon un même plan expérimental entre le Bouquetin des Alpes (en captivité) et la Chèvre domestique, ne sont pas équivalentes entre les deux

espèces. La distribution et la charge par organe de la souche vaccinale est beaucoup plus importante chez le Bouquetin des Alpes, qui exprime également une réponse immunitaire humorale plus intense et prolongée que la Chèvre domestique. L'observation d'une excrétion urogénitale puis de la transmission de la souche vaccinale d'individus vaccinés à un individu contact au sein du lot de bouquetins mâles est un fait remarquable à mettre en lien avec la plus grande sensibilité de l'espèce *Capra ibex* au vaccin Rev.1 comparativement aux espèces domestiques pour lesquelles ce vaccin a été conçu et homologué. Néanmoins, compte tenu des conditions de promiscuité importante dans lesquelles les bouquetins de cette expérimentation ont été placés, il est probable que le risque de transmission intra-spécifique de la souche vaccinale associé à une excrétion dans les urines serait inférieur dans les conditions naturelles.

Concernant l'utilisation du vaccin en nature, il convient de rappeler que, sur un plan opérationnel, la capture des bouquetins conditionne leur vaccination *in natura*. Or, la mise en œuvre de captures pour cette espèce est principalement possible entre fin avril et début juin, soit au cours du 2ème tiers de gestation des femelles bouquetins ce qui représente un risque élevé d'avortement post-vaccinal ; pour les captures réalisées en septembre-octobre (plus faibles effectifs), la période se situe deux mois avant le rut, représentant un risque potentiel de transmission vénérienne de la souche vaccinale. Les contraintes techniques liées à la capture de cette espèce sauvage en milieu montagnard, associée au risque d'excrétion observé au cours des deux mois suivant la vaccination des bouquetins (résultats de notre présente étude), ne permettent donc pas d'écarter un risque de diffusion intra-spécifique de la souche vaccinale et par conséquent, d'une séroconversion « accidentelle » d'animaux non infectés par la souche sauvage. De telles séroconversions pourraient compliquer la surveillance (interprétation à tort de séropositifs vaccinés mais non infectés par la souche sauvage) et la gestion du foyer sauvage (euthanasie à tort d'animaux porteurs de souche vaccinale non marqués), puisqu'il n'existe pas, à ce jour, de technique sérologique réalisable *in vivo* et au chevet de l'animal, permettant de distinguer les animaux infectés par la souche sauvage des animaux vaccinés par la souche Rev.1.

Concernant le risque environnemental que représenterait une vaccination *in natura* pour l'Homme et les espèces domestiques, l'excrétion de la souche vaccinale observée dans les urines de bouquetins ne pose a priori pas plus de risque que pour la souche sauvage déjà présente sur le site du Bargy, et vis-à-vis de laquelle ce mode de transmission a été jugé négligeable par un précédent groupe d'experts. Le pire scénario d'avortements brucelliques de femelles bouquetins qui pourraient faire suite aux campagnes de vaccination et de transmission de la souche vaccinale à d'autres animaux (sauvages ou domestiques) ne peut être complètement écarté. Néanmoins, le risque que représenterait ce pire scénario est à mettre en balance avec le risque associé à la large circulation de la souche sauvage actuellement observée chez les bouquetins du Bargy.

2. INTRODUCTION

2.1. Contexte du foyer de brucellose du Bargy et de la saisine interministérielle

Suite à la survenue de cas humains et bovins de brucellose en 2012 en Haute Savoie (Mailles *et al.*, 2012), une enquête de terrain conduite par l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) a révélé que la population de bouquetins des Alpes (*Capra ibex*) du massif du Bargy est un réservoir de brucellose (séroprévalence moyenne ~40 %), et est sans doute à l'origine de la réémergence de cette maladie éradiquée des troupeaux domestiques depuis les années 2000 (Hars *et al.*, 2015). Suite à cette découverte, des mesures d'abattage ciblés (animaux séropositifs ou cliniquement atteints) et massifs (2013 et 2015) ont été conduites sous réquisition préfectorale. Ces abattages ont conduit à abaisser de moitié la taille de la population de bouquetins (~600 animaux en 2013 contre ~300 animaux en 2016) (Marchand *et al.*, 2016). A ce jour, les animaux capturés lors des opérations de suivi et séropositifs sont toujours euthanasiés et autopsiés pour les besoins de la surveillance du foyer, et la brucellose circule toujours activement dans cette population en 2017 (S. Rossi comm. Pers.).

Dans son avis de 2015 relatif à la gestion de la brucellose des bouquetins du Bargy, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses) évoque la vaccination des bouquetins comme une piste sérieuse de gestion, en complément d'abattages ciblés et/ou massifs (Anses 2015). Suite à ce rapport, le ministère chargé de l'agriculture a sollicité un appui scientifique et technique auprès de l'Anses et de l'ONCFS, visant à définir et évaluer les critères préalables à une approche vaccinale contre la brucellose chez les bouquetins du massif du Bargy (Anses et ONCFS 2016). Ce rapport concluait que le principal critère à vérifier en amont d'une vaccination des bouquetins en nature est l'innocuité du vaccin vivant (souche « Rev.1 ») chez cette espèce.

Les ministres en charge de l'agriculture et de l'écologie ont consécutivement enjoint (courrier interministériel du 26 septembre 2016) l'Institut national de recherche agronomique (INRA), le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), l'Anses et l'ONCFS de conduire une expérimentation visant à comparer le niveau d'innocuité du vaccin Rev.1 conjonctival chez le bouquetin des Alpes et la chèvre domestique (*Capra hircus*). Cette étude, cofinancée par les deux ministères en charge, a été conduite conjointement par les 4 organismes susnommés, entre octobre 2016 et juillet 2017 ; les phases expérimentales ayant été conduites de janvier à avril 2017 chez le bouquetin au sein du Parc zoologique de la Haute Touche (MNHN) et de février à mai 2017 pour la chèvre domestique au sein de la plateforme infectieuse expérimentale de Nouzilly (INRA). L'Anses en sa qualité de laboratoire national de référence a apporté les garanties en matière d'utilisation du vaccin et de supervisions/confirmation des travaux bactériologiques effectués par le laboratoire vétérinaire de Tours. L'ONCFS a été désigné comme coordonnateur du projet. Le présent rapport technique fait état des résultats de cette étude et des recommandations d'utilisation en nature du vaccin Rev.1.

2.2. Historique de la vaccination à l'aide de la souche Rev.1

Les bactéries du genre *Brucella* sont des agents pour la plupart zoonotiques, touchant un grand nombre de mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins, porcins,...) ou sauvages (ruminants et suidés notamment). Douze espèces de *Brucella* sont actuellement connues, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. inopinata*, *B. papionis* et *B. vulpis*. *Brucella melitensis* est une espèce qui infecte principalement les petits ruminants (ovins et caprins) mais qui peut également infecter la plupart des ruminants domestiques et sauvages (cervidés, chamois, bouquetins, en particulier). La faune sauvage infectée peut, dans certains cas, constituer un réservoir de l'infection pouvant être à l'origine de la transmission des *Brucella* aux espèces animales domestiques et par voie de conséquence à l'homme. Dans la plupart des espèces, les *Brucella* induisent des troubles de l'appareil reproducteur (avortements, produits chétifs chez les femelles, orchites et épидидymites chez les mâles), et parfois des arthrites, dans les deux sexes. Les avortements ou mises-bas infectieuses conduisent à l'expulsion de placentas ou à la production de sécrétions génitales contaminées, à l'origine de contaminations animales et humaines par contact direct ou par voie aérienne (aérosols infectieux). Le lait de femelles infectées est également très souvent contaminé et à l'origine des contaminations par voie digestive, chez l'homme notamment. La résistance des *Brucella* peut être relativement longue dans l'environnement selon les conditions de température, hygrométrie et d'ensoleillement (jusqu'à plusieurs mois), de nombreux matériaux pouvant être à l'origine de contaminations animales ou humaines par contact (pâtures, foin, matériels d'élevage, vêtements, bottes, pneus de véhicules, etc.). La prévention des avortements joue donc un rôle majeur dans le contrôle de la maladie. La vaccination des petits ruminants par la souche vaccinale *Brucella melitensis* Rev.1, est un moyen permettant d'atteindre cet objectif. Reconnu comme le meilleur vaccin disponible actuellement pour la prévention de la brucellose chez les petits ruminants, notamment lorsqu'il est utilisé à dose standard ($0,5-2 \times 10^9$) par voie conjonctivale, celui-ci induit en effet une réduction significative des avortements brucelliques et du niveau d'excrétion de la bactérie par voie génitale dans les populations animales vaccinées massivement avant infection (pour revue, [Blasco, 2011](#)).

Brucella melitensis Rev.1 est une souche à virulence atténuée stable obtenue à partir d'une souche virulente de *B. melitensis* ([Elberg et Faunce, 1957](#)). C'est une souche mutante réverse non-dépendante de la streptomycine isolée à partir d'une population de bactéries dépendantes de la streptomycine, elle-même issue de la souche virulente. L'immunogénicité de cette souche atténuée, comme pour la souche B19 utilisée chez les bovins, est conditionnée par son aptitude à se multiplier chez l'hôte vacciné et à coloniser, au moins pendant une période limitée, différents tissus lymphoréticulaires (en premier lieu, les nœuds lymphatiques cibles drainant le site d'administration du vaccin avant distribution éventuelle à d'autres sites plus distants mais sans coloniser durablement les organes génitaux) ([Muñoz et al., 2008](#)). Elle a ainsi la capacité de persister suffisamment dans l'hôte pour permettre à celui-ci de développer une réponse immunitaire durable, de type cellulaire principalement. La stabilité de l'atténuation de cette souche a été largement démontrée aussi bien expérimentalement que lors de l'utilisation du vaccin sur le terrain ([Elberg, 1981, 1996](#)). Cette souche vaccinale a tout d'abord été administrée aux petits ruminants par voie sous-cutanée. Il a notamment été montré que la

protection vis-à-vis d'une épreuve avec une souche virulente de *B. melitensis* obtenue par vaccination de chèvres âgées de 3 à 7 mois conférait une protection d'au minimum 4,5 ans (Alton, 1966, 1968). L'utilisation de la souche Rev.1 sur le terrain à dose standard a permis, dans de nombreux pays, d'obtenir une réduction significative de l'incidence de la brucellose à *B. melitensis* aussi bien chez les petits ruminants que chez l'homme (Elberg, 1981, 1996) ainsi qu'une diminution des taux d'avortements. Ces effets ne sont observés significativement qu'à la condition d'une couverture maximale des populations animales et ceci, soit par vaccination de masse quel que soit l'âge, soit par vaccination des jeunes animaux impubères (3-6 mois) associée à une prophylaxie sanitaire de type « test-and-cull » (abattage ciblé) chez les adultes. (Blasco, 1997). Le choix de la vaccination d'animaux jeunes est lié aux inconvénients de la vaccination par Rev.1, avec, entre autres, la persistance pendant plusieurs mois d'une sérologie positive chez les animaux vaccinés après la puberté et la possibilité d'avortements induits lors de vaccination d'animaux gestants (Zundel et al., 1992).

La voie conjonctivale a été développée dans le but de réduire la durée de production d'anticorps post-vaccinaux. Expérimentalement, la vaccination Rev.1 à dose standard par voie conjonctivale induit une réponse sérologique inférieure à 4 mois, tant chez la chèvre que chez la brebis vaccinée entre 3 et 6 mois d'âge (Fensterbank et al., 1985 ; 1987) alors que la vaccination sous-cutanée induit une réponse détectable d'au moins 6 mois et parfois plusieurs années chez certains animaux. Ces résultats sont confirmés régulièrement dans les pays utilisant une stratégie de vaccination conjonctivale des animaux impubères (Stournara et al., 2007).

L'innocuité du vaccin Rev.1 administré par voie conjonctivale chez la chèvre a été également testée dans le cadre de la constitution d'un dossier d'AMM en France. L'évaluation de la persistance de la souche vaccinale dans les sécrétions lacrymales et de sa diffusion, locale et/ou à des animaux contacts non vaccinés (et particulièrement sensibles car en milieu de gestation), a permis de conclure que le risque de contamination de l'environnement par Rev.1 inhérent à son administration conjonctivale était négligeable. Par ailleurs, les résultats sérologiques obtenus avec les doses utilisées dans cette expérimentation (1.10^8 et 3.10^8 UFC) étaient semblables aux résultats publiés antérieurement pour des doses 1.10^7 et 1.10^9 UFC, soit une négativation en 4 mois (Isabelle Jacques, communication personnelle).

Le vaccin Rev.1 administré par voie sous-cutanée ou conjonctivale a été utilisé avec succès dans de nombreux pays (France, Espagne, Italie, Grèce, Portugal, Israël, Maroc, Mongolie, Tunisie, Turquie, notamment) que ce soit chez le jeune ou chez l'adulte à doses standard (Banaï, 2002 ; Blasco, 1997 et 2011). Les stratégies adoptées pour le contrôle de la brucellose ont été variables selon les pays. Toutefois, la stratégie la plus efficace dans le cas de régions où la prévalence de l'infection est élevée et où le mode d'élevage est extensif ou nomade, est la vaccination d'animaux jeunes et adultes par voie conjonctivale (Blasco, 1997 ; Minas, 2006). La protection adéquate est obtenue par une vaccination de 80 % de la population à risque (Garrido, 1992). Néanmoins, l'éradication n'a, à ce jour, été atteinte, que lorsque la vaccination, de masse ou limitée aux jeunes animaux impubères destinés au renouvellement des troupeaux, était associée, à terme ou en parallèle à une prophylaxie sanitaire par test-abattage des animaux adultes (exemples de la France et de nombreuses régions espagnoles, italiennes et portugaises).

2.3. Objectifs de l'étude

Les critères préalables à la vaccination des bouquetins en nature ont été examinés au cours d'un précédent travail d'expertise collective et de revue bibliographique (Anses et ONCFS 2016). Les experts ont recommandé de confirmer l'innocuité du vaccin Rev.1 chez cette espèce sauvage, son utilisation étant jugée possible en cas d'innocuité comparable entre le bouquetin et un référentiel domestique (ovin ou caprin), correspondant à l'AMM du vaccin et pour lequel un grand recul existe en matière de sécurité d'utilisation. En effet, la littérature nous apprend que les propriétés d'innocuité comme d'efficacité d'un vaccin anti-brucellique (vaccin vivant atténué) peuvent difficilement se transposer d'une espèce à l'autre, en particulier d'une espèce domestique vers une espèce sauvage, comme cela a été largement documenté en regard des vaccins RB51 et S19 chez le bison ou le cerf dans la région du Yellowstone (National Academies of Sciences, 2017). Pour des raisons réglementaires, techniques et éthiques précédemment développées lors de l'Appui Scientifique et Technique de 2016 (Anses et ONCFS 2016), il n'a pas été possible de réaliser un test d'innocuité clinique chez des femelles gestantes, ni un test d'efficacité vaccinale, nécessitant la réalisation d'un challenge infectieux. En effet, de tels tests supposeraient la disponibilité d'un environnement hautement confiné, adapté au bien-être des bouquetins et aux forts risques d'avortement brucellique et d'excrétion associée.

L'objectif de la présente expérimentation était donc de comparer l'innocuité de la souche vaccinale Rev-1 sous sa forme commerciale (OCUREV®, CZ Veterinaria SA, Porriño, Espagne), vaccin conjonctival applicable sous forme de collyre, **figure 1**) entre le bouquetin et la chèvre domestique. Cette étude s'est focalisée sur la comparaison interspécifique de la distribution de la souche vaccinale, de son excrétion et de la réponse immunitaire humorale.

Pour ce faire, deux études expérimentales couplées ont été conduites en niveau A1 dans deux établissements utilisateurs (EU) disposant des agréments et de la capacité d'hébergement requis: la Réserve zoologique de la Haute Touche (MNHN) pour les bouquetins, et la Plateforme d'Infectiologie expérimentale (PFIE) de Nouzilly (INRA) pour les chèvres domestiques.

L'étude a été planifiée sur 90 jours, des prélèvements et suivis ayant été prévus de façon séquentielle pour étudier la distribution de la souche vaccinale et sa capacité d'excrétion. Des suivis quotidiens par les animaliers, des mesures sérologiques, bactériologiques, zootechniques et hémato-/cytologiques ont été réalisés afin de suivre:

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

Après une phase de mise aux normes des bâtiments de la Haute Touche pour les besoins de l'étude, les 4 lots de bouquetins et de chèvres des 2 sexes ont suivi une phase d'acclimatation dans les bâtiments des deux EU. Une grande partie des animaux a été vaccinée, tandis que quelques individus non-vaccinés (témoins/contacts) ont été placés au contact de leurs congénères, pour apprécier

le risque de transmission intra-spécifique de la souche Rev.1. En raison de la nécessité des études bactériologiques sur de multiples organes pour apprécier l'innocuité du vaccin, l'ensemble des animaux (soit 12 bouquetins et 12 chèvres) a du être euthanasié au terme de cette étude.



Figure 1 : Présentation et mode d'administration conjonctival du vaccin OCUREV®

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Constitution des lots et conditions d'hébergement

Le recrutement des chèvres et des bouquetins s'est effectué dans un laps de temps contraint, d'un à deux mois à compter de la demande interministérielle. La volonté du consortium était de recruter des animaux de 2 à 4 ans répartis en deux lots comparables des deux sexes, de façon à pouvoir apprécier l'effet espèce, en s'affranchissant au maximum des effets âges et sexe. Les animaux visés devaient être sexuellement matures, de manière à se placer dans une situation proche du terrain (les bouquetins capturés en nature sont âgés de plus de 2 ans, [Marchand et al., 2016](#)) et représentative d'un risque d'excrétion brucellique plus élevé chez des individus sexuellement matures que chez des juvéniles immatures ([Muñoz et al., 2008](#)). Une des difficultés rencontrées était la comparabilité des états physiologiques des deux espèces à un âge donné, la croissance, la maturité sexuelle et la sénescence étant en effet plus précoce chez les caprins domestiques que chez les bouquetins. Pour cette raison, nous avons à la fois testé l'effet de l'âge et de la présence d'activité sexuelle (hormonale/semence) des animaux. Une liste de six agents pathogènes a été testée par sérologie en amont de l'introduction des animaux dans les EU : la brucellose (EAT et FC), la fièvre catarrhale ovine (FCO), le CAEV, la BD, la fièvre Q et la paratuberculose. Cette liste a été établie en conformité des pratiques à l'introduction d'animaux dans un Parc zoologique ou une animalerie, mais aussi de façon à confirmer l'absence de brucellose chez l'ensemble des sujets et d'anticiper un effet d'éventuelles co-infections sur l'expérimentation. Les bouquetins ont également été dépistés avant introduction vis-à-vis de la tuberculose par IDR (tuberculation comparée *M. bovis* et *M. avium*, protocole obligatoire dans les échanges inter-parcs). En outre, les chèvres et bouquetins ont été systématiquement déparasités à leur entrée dans les bâtiments (voir protocole détaillé ci-après).

3.1.1. Bouquetins

Les individus *Capra Ibex* ont été recrutés au sein des parcs zoologiques en exposant les objectifs visés par l'étude et sa finalité. Si les cinq parcs contactés ont tous répondu favorablement aux sollicitations, les individus indemnes de Brucellose (par EAT), CAEV (par ELISA Compétition sur sérum Caprin), FCO (sérologie ELISA et/ou PCR), Tuberculose (tuberculation comparée) ont été sélectionnés et prélevés depuis le parc des Angles (Les Angles, 66), le domaine de Pescheray (Le Breil-sur-Mérize, 72) et la Réserve zoologique de la Haute Touche (Obterre, 36) : cinq mâles et cinq femelles en provenance du parc des Angles, un mâle issu du parc de Pescheray et une femelle en provenance de la Réserve zoologique de la Haute Touche (**Tableau 1**). La mise en lots (mâles et femelles) a été effectuée fin novembre 2016 sur le site de la réserve de la Haute Touche (parcs extérieurs). Le confinement en bâtiment des deux lots d'animaux a été réalisé après achèvement des travaux d'aménagement et après agrément des locaux par la DDCSPP de l'Indre début Janvier 2017 (**Figure 2**). Un traitement antiparasitaire a été effectué à l'arrivée des animaux au Parc de la Haute Touche, et reconduit chez certains animaux

présentant des symptômes diarrhéiques à l'introduction dans les bâtiments (voir résultats).

3.1.2. Chèvres

Douze caprins de race Alpine ont été retenus pour cette étude et répartis en deux lots de

- Six boucs issus d'animaleries : cinq boucs âgés de 12 à 18 mois au début de l'expérimentation provenant du groupe CAPGENES et un bouc témoin issu de l'INRA de Lusignan âgé de 5 ans et introduit à J1. Ces six animaux étaient tous pubères (production de semence) et présentaient un statut sanitaire contrôlé,
- Six chèvres laitières de réforme : dont un individu contrôlé introduit à J1, âgées de 3 à 7 ans, issues d'un élevage et donc de statut sanitaire moins contrôlé.

L'ensemble de ces animaux a subi un traitement antiparasitaire à l'introduction dans les bâtiments (anthelminthique Fenbendazole/Panacur®). L'examen du statut sérologique des animaux à leur introduction dans la PFIE a confirmé l'absence d'exposition brucellique de l'ensemble des sujets, mais a en revanche permis de constater de multiples expositions pathologiques, en particulier chez les chèvres de réforme (**Tableau 2**). En particulier des réponses sérologiques positives vis-à-vis de la paratuberculose et la fièvre Q ont justifié un suivi clinique et d'excrétion (PCR sur fèces ou écouvillon vaginal) tout au long de l'étude.

a)



b)



c)



Figure 2 : hébergement des animaux: acclimatation en deux temps des bouquetins a) en enclos (photo R. Simon, MNHN) puis b) en bâtiments fermés au Parc de la Haute Touche (photo S Rossi, ONCFS), c) hébergement en groupe des caprinés domestiques au sein de la PFIE (photo C Ponsart, Anses).

Tableau 1 : Caractéristiques individuelles des 12 bouquetins et 12 chèvres inclus dans l'expérimentation et traitement vaccinal appliqué. Les mâles sont indiqués en bleu et les contacts on été indiqués en gras

Espèce	Début expé	Lot	Lieu	Naissance	Identifiant	Sexe	Age	Traitement	Date de mort	Génotype
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	A	Haute Touche	01/05/2013	1890	M	3-5 ans	vaccine	J45	A324-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	A	Haute Touche	01/05/2013	2000	M	3-5 ans	vaccine	J90	A324-A324
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	A	Haute Touche	01/05/2012	1895	M	3-5 ans	contact	J90	A330-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	A	Haute Touche	01/05/2012	1839	M	3-5 ans	vaccine	J45	A330-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	A	Haute Touche	01/05/2014	1828	M	<3 ans	vaccine	J45	A330-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	A	Haute Touche	01/05/2014	3094	M	<3 ans	vaccine	J90	A324-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	B	Haute Touche	01/05/2012	1926	F	3-5 ans	contact	J90	A324-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	B	Haute Touche	01/05/2012	1920	F	<3 ans	vaccine	J45	A324-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	B	Haute Touche	01/05/2012	1933	F	3-5 ans	vaccine	J45	A324-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	B	Haute Touche	01/05/2013	2393	F	<3 ans	vaccine	J90	A324-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	B	Haute Touche	01/05/2014	2349	F	<3 ans	contact	J45	A324-A330
<i>Capra ibex</i>	16/01/2017	B	Haute Touche	31/05/2002	7462	F	>5 ans	vaccine	J90	A324-A324
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	C	PFIE	31/08/2015	62107	M	<3 ans	vaccine	J90	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	C	PFIE	04/02/2016	16142	M	<3 ans	vaccine	J45	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	C	PFIE	16/02/2016	06145	M	<3 ans	vaccine	J45	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	C	PFIE	14/02/2016	61003	M	<3 ans	vaccine	J45	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	C	PFIE	15/02/2016	61275	M	<3 ans	vaccine	J90	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	C	PFIE	03/12/2012	13101	M	3-5 ans	contact	J90	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	D	PFIE	30/08/2010	10139*	F	>5 ans	vaccine	19/02/2017*	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	D	PFIE	26/08/2011	20055*	F	>5 ans	vaccine	27/03/2017*	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	D	PFIE	07/09/2012	30313*	F	3-5 ans	vaccine	12/02/2017*	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	D	PFIE	31/08/2013	40176	F	3-5 ans	vaccine	J90	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	D	PFIE	02/09/2014	50105	F	<3 ans	vaccine	J90	
<i>Capra hircus</i>	06/02/2017	D	PFIE	27/08/2011	20072	F	>5 ans	contact	J90	

* mort de 3 chèvres intervenue en cours d'expérimentation, seule la 20055 a été incluse dans l'analyse*

Tableau 2 : Statut sanitaire (sérologique et PCR) des chèvres domestiques

N° des caprins	Brucellose	FCO (séro)	BVD (PCR + séro)	FQ (séro)	ParaTub (séro)	CAEV (séro)
F-50105	-	-	-	+	-	-
F-40176	-	-	-	-	+	-
F-20055	-	-	-	+	-	-
F-30313	-	-	-	+	+	-
F-20027	-	-	-	+	douteux	-
F-10139	-	-	-	+	+	-
M-117	-	-	-	-	-	-
M-196	-	-	-	-	-	-
M-520	-	-	-	-	-	-
13101	-	-	-	+	-	-
M-525	-	-	-	-	-	-
M-344	-	-	-	-	-	-

3.2. Génotypage des bouquetins en lien avec la résistance naturelle à la brucellose

De manière à ajuster les résultats quant à l'influence du fond génétique des bouquetins sur la réponse immunitaire observée après vaccination (en plus d'un éventuel effet espèce), nous avons ciblé le typage des allèles du gène SLC11A1 (solute carrier family 11 member A1). Ce gène SLC11A1 code pour une protéine de reconnaissance appelée NRAMP, impliquée dans l'activation des macrophages et conférant une certaine résistance à plusieurs infections bactériennes, dont la brucellose. Des investigations complémentaires restent nécessaires pour éclairer tous les mécanismes de cette résistance et en quantifier les effets (Kumar *et al.*, 2011, Iacoboni *et al.*, 2014). Le polymorphisme a été caractérisé par le génotypage d'un marqueur microsatellite présent dans une région intronique du gène SLC11A1 (Vacca *et al.*, 2011). Les typages ont été effectués par l'équipe INRA (UR 035) de Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS). Deux allèles sont présents chez le bouquetin des Alpes, nommés «A324 » et «A330 » en référence à la taille de motifs amplifiés. Un travail préliminaire sur la population du Bargy suggère que ce gène joue un rôle dans la résistance des bouquetins à la brucellose en milieu naturel, la présence de l'allèle «A330» étant négativement corrélée à la séroprévalence (Quéméré *et al.*, in prep). Pour des raisons méthodologiques, il n'a pas été possible de tester les chèvres de cette expérimentation et donc seuls les bouquetins ont fait l'objet d'un typage. Sur la base de ce typage, les bouquetins ont été classés homozygotes «A324» (*a priori* sensibles), homozygotes «A330» (*a priori* résistants), ou hétérozygotes (*a priori* partiellement résistants). L'effet de ce typage a ensuite été testé, notamment vis-à-vis du degré d'envahissement et de charge bactérienne des organes des individus vaccinés.

3.3. Procédures appliquées aux animaux

3.3.1. Calendrier

Le calendrier des procédures réalisées chez les différents lots de chèvres et de bouquetins est résumé dans la **Figure 3** ci-après. Au sein de chaque lot, 4 à 5 individus ont été vaccinés par voie conjonctivale à l'aide du vaccin OCUREV® à la dose de $2 \cdot 10^9$ UFC/mL de la souche Rev.1 (**Tableau 1**). Les bouquetins ont été

vaccinés le 16 janvier 2017 et les chèvres le 06 février 2017¹ de façon à ce que le LVD de Tours puisseensemencer la totalité des cultures bactériennes immédiatement après autopsie, à l'exception des hémocultures toutes réalisées au LNR de l'Anses. Des prélèvements détaillés ci-après ont été effectués à J-10, J0, J20, J45, J65 et J90 post vaccination. Les chèvres ont également été prélevées à J7 afin de vérifier la séroconversion du modèle domestique. Deux séries d'autopsies, de 3 mâles et 3 femelles par espèce, ont été programmées à J45 et J90 post-vaccination afin d'apprécier la cinétique de la distribution bactérienne, une disparition ou forte diminution de la distribution bactérienne étant attendue à J90 au vu de la littérature.

3.3.2. Prélèvements sur animaux vivants

Les chèvres et bouquetins ont été manipulés sans anesthésie au moyen d'une contention manuelle adaptée. Les personnels de la Haute Touche et de la PFIE sont formés et tout à fait aguerris à ce type de contention (**Figure 3**). En particulier, les soigneurs du parc de la Haute Touche manipulent des bouquetins des Alpes et autres ongulés sauvages depuis de très nombreuses années. Des prises de sang ainsi que trois écouvillons nasal, oculaire (côté vaccination pour les vaccinés, bilatéral pour les contacts) et génital (préputial/vaginal) ont été effectués à J-10, J0, J20, J45, J68 et J90 post-vaccination afin de suivre la bactériémie, l'excrétion de la souche Rev.1 et la réponse sérologique de l'ensemble des animaux. Le sang a également été utilisé pour effectuer des hémocultures (indicateur de bactériémie), des dosages hormonaux chez les femelles des deux espèces (indicateur de leur activité ovarienne), la numération sanguine (indicateur de la réponse immunitaire et de l'état de santé) et le stress oxydatif des globules blancs (indicateur de la capacité immunitaire immédiate et du stress de manipulation). Les envois des prélèvements sanguins ont été effectués sous 24 h et à température contrôlée par un transporteur agréé vers les laboratoires de l'Anses (sérologie), de l'URCA de Reims (mesures de ROS), et de l'Inra PFIE (NF). Un plasma filtré à l'Anses dans des conditions contrôlées, et exempt de *Brucella*, a ensuite été transmis au LNCR pour la réalisation de dosages hormonaux (progestérone et hormone de gestation).

3.3.3. Prélèvements sur animaux morts

- Euthanasies

Les euthanasies ont été conduites conformément à la demande d'autorisation du projet et aux dates prévues par le protocole expérimental. A J45 et J90, la moitié des individus ont été euthanasiés par injection intraveineuse de barbituriques (Pentobarbital) (Doléthal® à 50 mg/kg ou Euthasol® à raison de 1ml/10 kg injecté dans la veine jugulaire), afin de procéder au prélèvement des organes/nœuds lymphatiques pour réalisation des cultures bactériennes (détails indiqués au tableau 3). En amont de l'injection létale, les bouquetins ont préalablement été anesthésiés à l'aide d'un fusil hypodermique afin de limiter stress et douleur (injection IM d'un mélange Médétomodine-Kétamine-Azapérone).

¹ A noter l'introduction d'animaux contacts, une chèvre et un bouc dans chaque lot de même sexe, ne s'est finalement réalisée que le 7 février 2017 (J+1 post vaccination)

- **Autopsies**

Après euthanasie, les autopsies ont été effectuées au sein du bâtiment A3 de la PFIE en raison du classement réglementaire de la souche Rev.1 (MOT) et du risque potentiel pour le manipulateur. L'ensemble des organes et écouvillons ont été acheminés « en frais » au laboratoire vétérinaire de Tours pour la réalisation de cultures bactériennes, également dans un laboratoire agréé, possédant des installations de haut niveau de biosécurité (L3). Les prélèvements sanguins ont été acheminés auprès de laboratoires spécialisés par le biais d'un transporteur agréé vis-à-vis de matériels biologiques.



Figure 3 : manipulation et réalisation de prélèvements sur les bouquetins des Alpes au sein du bâtiment du Parc de la Haute Touche (photos P. Roux, MNHN)

3.3.4. Ethique du projet

Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives du Conseil européen (2010/63 / UE) et à leur transcription dans la législation française (articles R214-87 à R214-137, du Code rural et décret n° 2013-118 du 1er février 2013 publié le 7 février, 2013). Toutes les procédures expérimentales ont été évaluées et approuvées par le Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur et le

comité d'éthique du Val de Loire (CEEA VdL, comité numéro n ° 19, numéro 2016112111336721.V4 - 7643) pour les caprins domestiques ; le comité d'éthique Cuvier (MNHN) a, pour sa part, approuvé l'expérimentation effectuée chez les bouquetins (Ref CEEA n°68 #7913). La règle des 3Rs a été respectée et a été la suivante : (i) et remplacement et (ii) réduction : en l'absence de méthode alternative pour mesurer l'efficacité vaccinale, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été déterminé grâce au plan d'expérience utilisé pour évaluer l'efficacité du vaccin et la capacité de l'autre expérimentation à maintenir des bouquetins semi-sauvages confinés; (iii) Raffinement : un enrichissement social : animaux regroupés en lot de même sexe (vie en groupe) et la visite bi-journalière des techniciens animaliers et de structure (paillage, tremplin, mise en place de ballon et de pierre de sel). Les points limites ont été définis comme suit : les animaux seront euthanasiés si leur état clinique ne laisse aucun doute sur leur souffrance et/ou sur une issue fatale. En particulier, l'association d'au moins trois signes cliniques tels que hyperthermie ($> 41^{\circ}\text{C}$), polypnée, tachycardie, prostration, anorexie, diarrhée, amaigrissement, plainte... pendant une période de plus de 48 h, conduira de fait à l'euthanasie des animaux par injection intraveineuse de barbituriques (voir détail des protocoles précédemment).

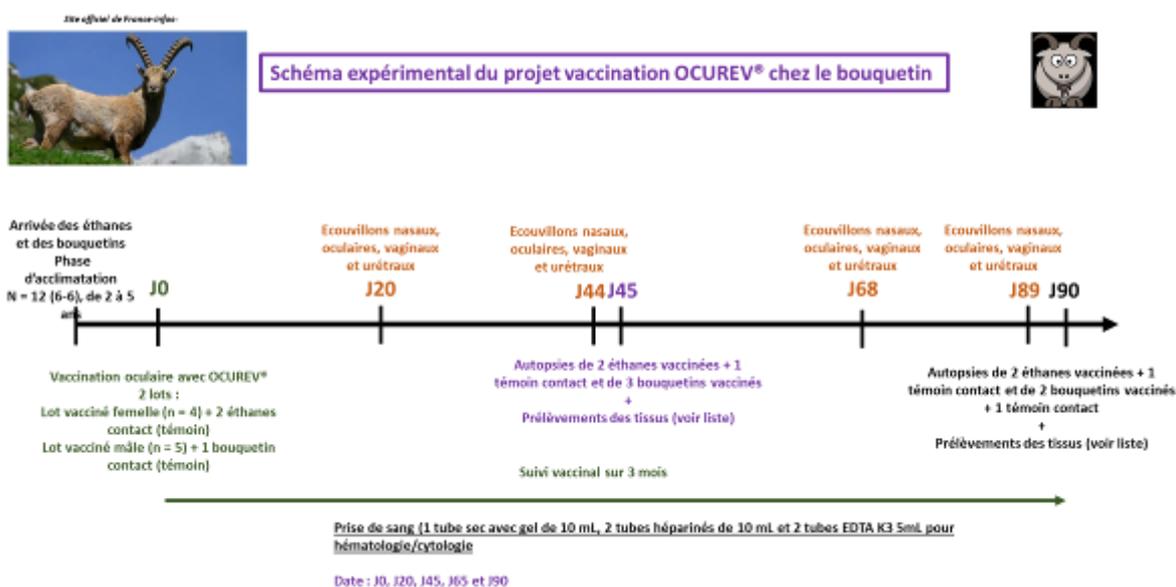


Figure 3 : Autopsies et réalisation de prélèvements en conditions L3 de la PFIE (photos C Ponsart, Anses & M Riou, Inra).

Tableau 3 : Liste des échantillons soumis à examens bactériologiques. Les organes analysés de façon prioritaire en frais sont indiqués en gras, les prélèvements sur animaux vivants figurent en bleu, ceux sur animaux uniquement autopsiés en violet. Les prélèvements bilatéraux (G=Gauche ; D=droit) ont été traités séparément ou poolés avant analyse

Type	Prélèvements (traités à l'état frais ou congelé)	Statut vivant	Animaux vaccinés	Animaux contacts
Ecouvillons	Ecouvillon oculaire (Frais, côté inoculation)	Vivant et autopsiés	1 écouvillon côté inoculation (Frais)	2 écouvillons Encensement G+D (Frais)
	Ecouvillon nasal (Frais, côté inoculation)	Vivant et autopsiés	1 écouvillon côté inoculation (Frais)	2 écouvillons Encensement G+D (Frais)
	Ecouvillon vaginal ou urétral (Frais)	Vivant et autopsiés	1 écouvillon	1 écouvillon
	Ecouvillon vésical (frais)	Autopsiés	1 prélèvement	1 prélèvement
Fluides	Sang (frais)	Vivant et autopsiés	1 tube de sang hépariné 4 ml	1 tube de sang hépariné 4 ml
	Urine (Frais)	Autopsiés	1 prélèvement	1 prélèvement
Tissus	NL rétro-pharyngiens médians et latéraux (Frais / Congelé)	Autopsiés	Côté inoculation (Frais) Autre côté (congelé)	Pool G+D (Frais)
	NL parotidiens (Frais / Congelé)	Autopsiés	Côté inoculation (Frais) Autre côté (congelé)	Pool G+D (Frais)
	NL sous-maxillaires (Frais / Congelé)	Autopsiés	Côté inoculation (Frais) Autre côté (congelé)	Pool G+D (Frais)
	NL rétro-mammaires (femelles) ou inguinaux (mâles)	Autopsiés	Pool G+D (Frais)	Pool G+D (Frais)
	NL iliaques internes (frais)	Autopsiés	Pool G+D (Frais)	Pool G+D (Frais)
	NL scapulaires (congelé)	Autopsiés	2 NL	2 NL
Organes	Rate	Autopsiés	1 rate	1 rate
	Utérus ou testicules (congelé)	Autopsiés	1 utérus ou 2 testicules	1 utérus ou 2 testicules

- (a) Bouquetins des Alpes



- (b) Chèvres domestiques

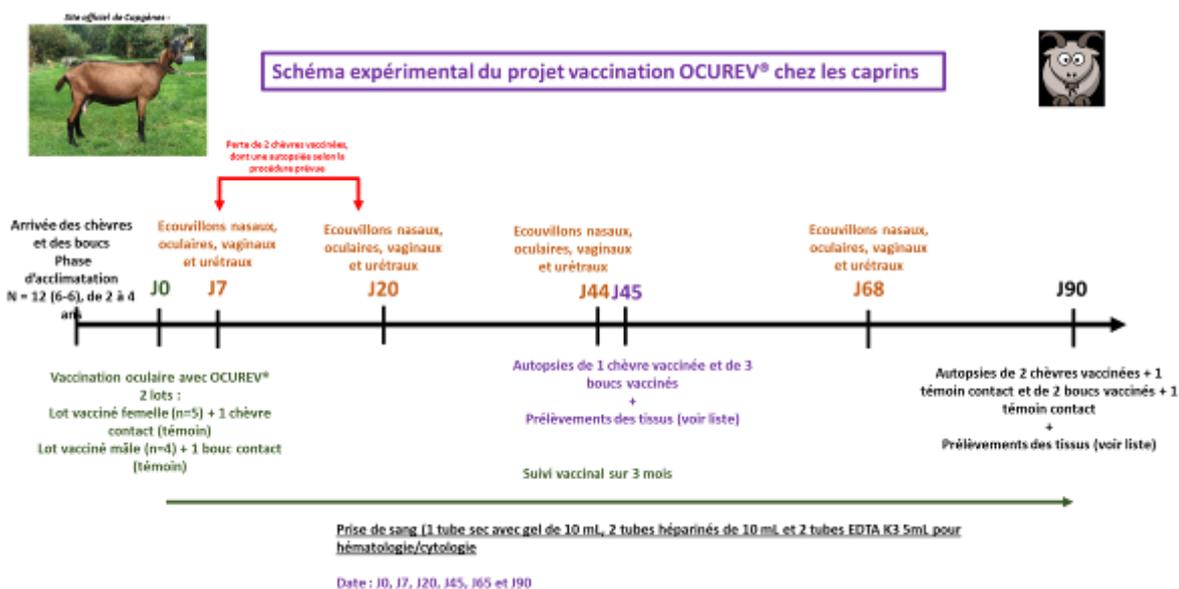


Figure 4 : Schémas expérimentaux détaillant les procédures appliquées aux deux espèces : (a) Bouquetins des Alpes et (b) Chèvres domestiques

3.4. Tests de laboratoire

3.4.1. Tests sérologiques

Trois méthodes reconnues chez les petits ruminants ont été mises en œuvre selon un protocole et avec des réactifs conformes aux exigences de l'Union Européenne et du Manuel terrestre de l'OIE (Chapitre 2.1.4, Manuel OIE, 2016).

- ***l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT)*** : la recherche d'anticorps contre la brucellose a été réalisée selon la norme U 47-003 (AFNOR, 2009a), en utilisant un antigène commercial contrôlé au préalable (Pourquier® Rose Bengale Ag, Montpellier, France). Les résultats sont exprimés sous forme d'un score de 0 (absence d'agglutination) à 4 (agglutination maximale).
- ***la Fixation du Complément (FC)*** : la recherche d'anticorps contre la brucellose a été réalisée selon la norme U 47-004 (AFNOR, 2009b), en utilisant un antigène commercial contrôlé au préalable (Pourquier® CFT Brucellosis Ag, Montpellier, France). Les titres correspondant à la dilution limite (dernière dilution associée à un résultat positif) ont été estimés. Les résultats sont exprimés en unités CFT / ml.
- ***une méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indirecte*** : la recherche d'anticorps contre la brucellose a été testée par un kit applicable aux ovins/caprins (IDEXX® Brucellosis Ovine/Caprine Ab Test, Westbrook, USA), mis en œuvre en respectant le mode opératoire du fabricant, avec un lot de kits préalablement contrôlé. La densité optique (DO) de l'échantillon a été lue par un spectrophotomètre, puis les résultats ont été exprimés quantitativement, sous forme d'un index correspondant au ratio S/P (ratio des différences de DO entre l'échantillon et les contrôles du kit). Le résultat est considéré comme positif si l'index est supérieur à 110-120 %.

3.4.2. Examens bactériologiques

Hémocultures

La totalité des sangs totaux prélevés en tubes héparinés aux différents stades post-vaccination (7, 20, 45, 65 et 90 jours) ont été mis en culture (dilution 1/5) en bouillon nutritif (milieu trypticase-soja additionné de 5 % de sérum de cheval) et incubés à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ (5-10 %). Deux repiquages sur milieu solide (Oxoid Blood Agar Base N°2 additionné de 5 % de sérum de cheval) ont été effectués respectivement 3 ou 4 et 8 ou 9 jours après le début de l'enrichissement en bouillon.

Culture directe sur leucocytes

La fraction leucocytaire des sangs totaux prélevés a été récupérée après une lyse des hématies par un tampon (chlorure d'ammonium / Tris) et plusieurs cycles de centrifugation. Celle-ci a étéensemencée directement sur milieu solide nutritif (Oxoid Blood Agar Base No2 additionné de 5 % de sérum de cheval) incubés à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ (5-10 %). Cette méthode permet de s'affranchir des éventuels effets bactéricides de certains composants du sang.

Tout résultat positif en hémoculture ou en culture directe des leucocytes a été considéré comme révélateur d'une bactériémie.

- **Recherches bactériennes à partir des tissus et des écouvillons**

Les écouvillons ont été humectés avec du PBS 1X stérile avant ensemencement sur 2 boîtes du milieu sélectif de Farrell. Tous les organes ont été broyés en PBS 1X stérile dont le volume est fonction du poids de l'organe et dilué au demi. 200 µl de suspension diluée ont été déposés sur 2 ou 4 géloses Farrell (fonction de la taille de l'organe). Les géloses ont été incubées à 37°C pendant 7 à 10 jours (pour les négatives, lecture à J7). Les souches ont été ré-isolées et ensuite envoyées à l'Anses pour identification.

- **Identification des souches isolées :**

L'identification des souches isolées a été réalisée sur la base d'un ensemble de caractères (référentiels : NF U 47-105, AFNOR, 2004 ; Alton *et al.* 1988 ; Chapitre 2.1.4 du Manuel de l'OIE, 2016). Pour chacune des souches isolées, les caractères de culture tels que besoin en CO₂, production d'H₂S, activités uréase et oxydase, ont été observés ainsi que les propriétés d'agglutination avec des sérums monospécifiques dirigés contre le lipopolysaccharide ou LPS (anti-A, anti-M, and anti-R), la sensibilité aux colorants (fuchsine basique et thionine) et aux antibiotiques (benzylpénicilline 3 µg /mL et streptomycine 2.5 µg/mL) et la lysotypie par des phages (Tb, Wb, Iz, R/C). Ces critères permettent de confirmer le genre et l'espèce de *Brucella* ainsi que d'identifier les caractères propres à la souche vaccinale *Brucella melitensis* Rev.1.

3.4.3. Contrôle du lot de vaccin

Le lot 164164 du vaccin vivant atténué Ocurev® (CZ Veterinaria SA, Porriño, Espagne) utilisé dans l'expérimentation a été contrôlé par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour la brucellose, conformément aux exigences de l'OIE (Chapitre 2.1.4 du Manuel de l'OIE, 2016) selon les critères suivants :

- **Pureté** : la pureté est vérifiée par observation d'au minimum 10 champs de lecture d'un frottis en coloration de Gram du vaccin dilué.

- **Viabilité** : la viabilité est évaluée par dénombrement des *Brucella* de 3 flacons de vaccin repris avec le diluant commercial, sur milieu nutritif solide (Oxoïd Blood Agar Base No2 additionné de 5 % sérum de cheval). Pour chaque flacon de vaccin testé et chaque dilution ensemencée (trois par flacon), 5 dénombrements des colonies sur milieu solide sont réalisés. Ceci permet d'évaluer les résultats en termes d'homogénéité des manipulations et du produit testé.

- **Taux de dissociation** : le taux de dissociation correspond à la proportion des colonies en phase lisse par rapport aux colonies en phase rugueuse ; il est déterminé par une coloration des colonies bactériennes par une solution de cristal violet (méthode de White et Wilson) sur au moins 6 ensemencements de dénombrements. Le taux moyen de dissociation est déterminé à partir du nombre de colonies rugueuses et lisses évaluées sur chaque ensemencement. Pour la souche vaccinale Rev 1 (souche lisse), le critère de validation (Chapitre 2.1.4 du Manuel OIE, 2016) de ce taux est inférieur à 5 % de colonies rugueuses.

- **Identification de la souche vaccinale** sur la base d'un ensemble de caractères bactériologiques phénotypiques (référentiels : NF U 47-105, AFNOR, 2004 ;

Alton *et al.*, 1988 ; Chapitre 2.1.4 du Manuel de l'OIE, 2016) : besoin en CO₂, production d'H₂S, activités uréase et oxydase, agglutination avec des sérums monospécifiques dirigés contre le LPS (anti-A, anti-M, and anti-R), sensibilité aux colorants (fuchsine basique et thionine) et aux antibiotiques (benzylpénicilline 3 µg/mL et streptomycine 2.5 µg/mL), lysotypie par des phages (Tb, Wb, Iz, R/C). Ces critères permettent de confirmer le genre et l'espèce de *Brucella* ainsi que d'identifier les caractères propres à la souche vaccinale *Brucella melitensis* Rev.1.

- **Vérification de la dose** : le nombre de colonies (exprimé en unités formant colonies ou UFC/mL) contenues dans le vaccin a été estimé par dénombrement des *Brucella* de 3 flacons de vaccin repris avec le diluant commercial, sur milieu nutritif solide (Oxoid Blood Agar Base N°2 additionné de 5 % sérum de cheval). Pour chaque flacon de vaccin testé et chaque dilution ensemencée (trois par flacon), 5 dénombrements des colonies sur milieu solide ont été réalisés (Chapitre 2.1.4 du Manuel OIE, 2016). Ceci permet d'évaluer les résultats en termes d'homogénéité des manipulations et du produit testé. La dose obtenue est comparée à la dose vaccinale recommandée, soit 0,5 à 2,0 10⁹ UFC/mL pour une utilisation conjonctivale du vaccin Rev.1 (Chapitre 2.1.4 du Manuel OIE, 2016).

Contrôle additionnel d'un flacon utilisé le jour des vaccinations :

Pour le contrôle supplémentaire d'un flacon testé le jour des vaccinations, des dilutions de raison 10 de l'inoculum ont été effectuées au laboratoire de la PFIE et 0,2 mL de chaque dilution ont été étalés sur 1 boîte de gélose (TSA-Ye) pour contrôle. La dilution finale a été étalée sur 5 boîtes de gélose, soit 1 mL au total. Les boîtes ont été observées à J2 pour vérifier la croissance éventuelle de contaminants. Les colonies de la souche Rev.1 ont ensuite été comptées à J7.

3.5. Suivis cliniques

3.5.1. Numération sanguine

La numération sanguine ou numération formule (NF) a été suivie au niveau individuel tout au long de l'expérimentation (**Figure 3**). Cette NF détaille les concentrations des trois populations de cellules sanguines (leucocytes/globules blancs/globules blancs, érythrocytes/hématies/globules rouges et thrombocytes/plaquettes) ainsi que le pourcentage des cinq sous-populations de leucocytes (lymphocytes, monocytes, granulocytes neutrophiles, granulocytes éosinophiles et granulocytes basophiles). Les caractéristiques de la population de globules rouges sont de bons indicateurs de bien-être et d'état sanitaire chez les mammifères (par ex. hématocrite, volume globulaire moyen (VGM), concentration d'hémoglobine). Les plaquettes peuvent interagir avec les bactéries dans la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi ces différentes mesures, une attention particulière a été portée à la concentration en globules blancs et au ratio neutrophiles/lymphocytes (N/L), qui varient habituellement suite à une infection bactérienne et/ou une vaccination anti-brucellique. La concentration en hématies et plaquettes a par ailleurs été examinée comme un indicateur de la santé des animaux. Ce comptage cellulaire a été réalisé au sein de la PFIE à l'aide d'un cytomètre calibré sur le modèle « chèvre domestique ».

3.5.2. Capacité oxydative des globules blancs (ROS)

La capacité de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les globules blancs est utilisée comme un indicateur de la capacité immunitaire et du stress chez les vertébrés supérieurs (Koch et Hill 2017). Les cinétiques individuelles des niveaux de « ROS » basaux, stimulés et du ratio Stimulé/Basal (S/B) ont été étudiés en lien avec le traitement des animaux, leur sexe et l'espèce. Le niveau de ROS basal a été considéré comme un indicateur de l'état d'activation du système immunitaire en lien avec l'environnement de l'animal (s.l.), tandis que le ratio S/B a été utilisé comme un indicateur de la capacité de réponse des cellules et du stress des animaux à un temps t (ex : stress de manipulation) (Esteruelas et al., 2016).

Cette mesure a été réalisée par cytométrie en flux au sein de la plateforme cytométrique de l'URCA dans les 24-48 h suivant la réalisation du prélèvement sanguins sur EDTA. Les leucocytes ont été isolés par lyse des érythrocytes (Tris-NH₄Cl 140 mM, pH 7,5), comptés et déposés dans une plaque de 96 puits à raison de 20 000 cellules par puits. Les cellules ont été placées en incubation en présence ou en absence d'un antigène stimulant de 100 nM de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma P8139). Après 30 minutes, 10 µM de Dihydrorodamine 123 (DHR123, Sigma D1054) ont été ajoutés à chaque puits. Cette sonde, non fluorescente, s'oxyde en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour devenir fluorescente. Après 30 minutes dans l'obscurité les cellules sont analysées avec un cytomètre BD Accuri C6 et la fluorescence de la sonde collectée à 525±30 nm après excitation par un laser 488nm. La fluorescence est exprimée en unité arbitraire et l'indice de stimulation correspond au ratio de fluorescence des cellules exposées au PMA / indice de ROS basal.

No Individu			
Loge			
Date (début état constaté)			
Comportement		Total	
Vocalisations anormales	<input type="checkbox"/>		1
Abattement/prostration	<input type="checkbox"/>		2
Comportement anormal	<input type="checkbox"/>		2
Isolement du groupe, rejet par les autres	<input type="checkbox"/>		3
Respiration anormale	<input type="checkbox"/>		2
Confort thermique		Total	
Respiration rapide	<input type="checkbox"/>		1
Respiration gueule ouverte	<input type="checkbox"/>		3
Prise de boisson +++ et/ou agitation	<input type="checkbox"/>		1
Tremblements	<input type="checkbox"/>		2
Prise alimentaire		Total	
Mange peu ou moins qu'avant (dysorexie)	<input type="checkbox"/>		2
Ne mange plus (anorexie)	<input type="checkbox"/>		3
Etat corporel		Total	
Maigreux ou perte d'état	<input type="checkbox"/>		2
CONCLUSION			
SCORE:			
Score < 3: inconfort/douleur modérée. Score compris entre 3 et 6 : inconfort/douleur importante. Score ≥ 6: inconfort/douleur extrême			

Figure 5 : éthogramme appliqué sur les caprinés domestiques

3.5.3. Suivis comportementaux

Une fiche clinique (éthogramme) a été mise en place pour les caprinés domestiques comme sauvages (**Figure 5**). L'examen des animaux était effectué quotidiennement à la Haute Touche et tous les deux jours à la PFIE. Les animaux atteints de signes cliniques étaient examinés par des vétérinaires et consécutivement traités, euthanasiés et autopsiés en lien avec les points limites définis plus haut (éthique).

3.6. Analyses statistiques

Les résultats bactériologiques et sérologiques ont été résumés entre J20 et J90 pour chaque individu. Concernant les résultats bactériologiques et sérologiques, l'étude quantitative s'est focalisée sur les individus vaccinés au départ de l'expérimentation, et non morts avant J20. Deux chèvres vaccinées (individus 10139 et 30313), retrouvées mortes respectivement à J6 et J13 post-vaccination ont été exclues de l'analyse.

3.6.1. Distribution de la souche vaccinale au niveau individuel

Dans un 1^{er} temps, nous avons examiné la proportion d'organes infectés (hémocultures incluses), de manière à quantifier le degré d'envahissement de l'organisme par la souche vaccinale. Dans un second temps, nous avons considéré la proportion d'organes infectés uniquement dans la sphère uro-génitale, c'est à dire incluant les écouvillons vésicaux, urétraux, vaginaux, ainsi que les cultures bactériennes réalisées à partir des nœuds lymphatiques (NL) rétro-mammaires, inguinaux, et sacro-iliaques, de manière à apprécier le degré d'envahissement de ces organes et le potentiel d'excrétion associé. Dans les deux cas, nous avons testé l'effet du mode de prélèvement (*in vivo* uniquement des écouvillons et sang, dissection cumulant organes et écouvillons), l'âge de l'animal, son sexe, son espèce, et l'étape concernée (J20, J45, J65, J90). Nous avons également testé l'interaction entre l'étape et l'espèce.

Ces données ont été analysées à l'échelle des individus*étape et encodées en nombre de succès (c.à-d., organes infectés), nombre d'échecs (c.à-d., organes non infectés), la variable d'intérêt étant la proportion d'organes infectés à chaque étape. Nous avons utilisé un modèle logistique mixte à l'aide de la fonction `glmer` du package `lme4` pour le logiciel R. La sélection des modèles s'est basée sur le critère d'Akaike corrigé pour de faibles tailles d'échantillons (AICc), deux modèles étant considérés comme d'ajustement équivalents aux données dans un $\Delta AICc < 2$. L'ensemble des modèles a été testé grâce à la fonction `dredge` du package `MuMIn` pour le logiciel R et les meilleurs modèles ont été retenus pour l'estimation des paramètres selon le principe de modèle averaging, en utilisant la fonction `model.avg` du package `MuMIn`.

3.6.2. Charge bactérienne au niveau des organes infectés

Les résultats de chaque organe prélevé ont été résumés en termes de charge bactérienne. L'analyse quantitative s'est focalisée sur les résultats bactériologiques positifs des animaux vaccinés observés entre J20 et J90. Nous avons estimé la somme des colonies observées sur l'ensemble des boîtesensemencées par organe,

sachant que le nombre maximum a été volontairement plafonné à 300 (nombre maximum de colonies estimable par boîte). Cette variable a été log-transformée de façon à la normaliser (la donnée brute étant bimodale et tronquée). Nous avons adopté une procédure de modélisation de type modèle linéaire mixte (lmm) ; par ailleurs, un offset a été introduit correspondant au nombre de boîtes ensemencées pour chaque organe. En plus des effets de l'âge, du sexe, de l'espèce et de l'étape (J20, J45, J65, J90), nous avons introduit l'effet du type d'organe (écouvillon, nœud lymphatique ou urine) qui peut logiquement influencer la charge bactérienne. Nous avons défini une localisation à chaque organe selon 4 classes. Nous avons regroupé les écouvillons nasaux et oculaires représentant une colonisation haute et un risque environnemental a priori faible (Ex-head), les NL de la tête représentant un envahissement locorégional attendu en cas de vaccination (LN-head), les NL de la sphère uro-génitale étant indicateurs d'un envahissement systématique et d'un risque d'excrétion sur le plus long terme (LN-urogenit), les écouvillons vésicaux, génitaux et l'urine, représentant un risque important de contamination environnementale (EX-urogenit) (**Figure 6**). Chez les bouquetins, nous avons également testé l'effet du génotype selon trois classes : animal a priori résistant (homozygote A330), sensible (homozygote A324) ou intermédiaire (hétérozygote). Nous avons utilisé la fonction lmer du package lme4, et comme précédemment, la sélection des modèles s'est appuyée sur le critère d'Akaike corrigé pour de faibles tailles d'échantillons (AICc).

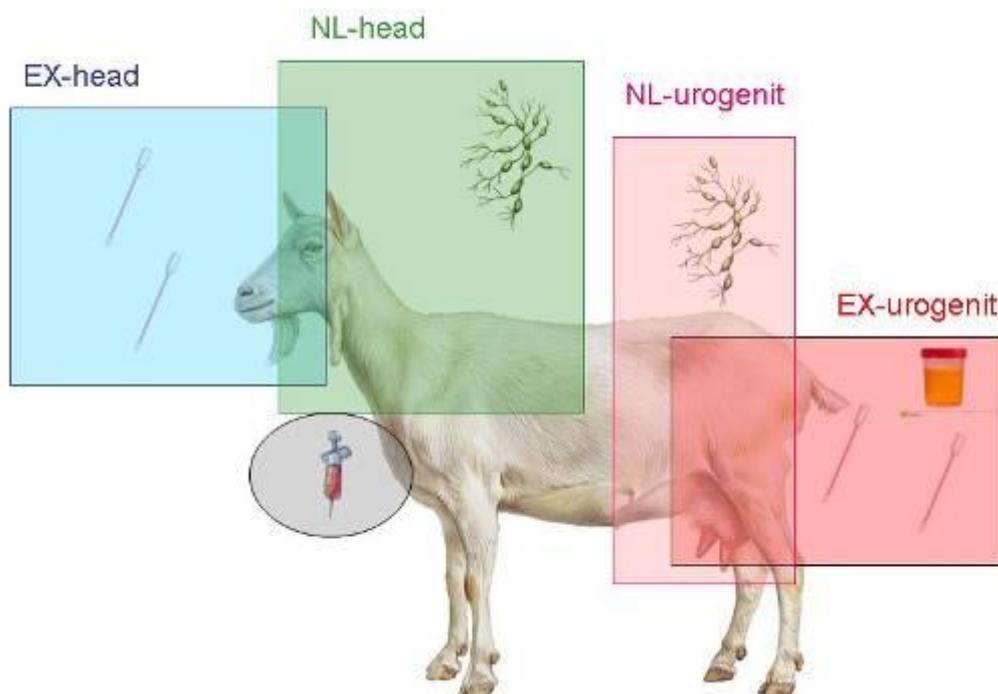


Figure 6 : Localisation des organes et interprétation de leur classe d'excrétion : Ex_head pour les écouvillons oculaires et nasaux ; NL_head pour les NL de la tête (invasion loco-régionale) ; NL urogenit pour les NL de la sphère urogénitale témoin d'une invasion systémique large et d'un risque d'infection latente ; Ex-urogenit regroupant l'urine et les écouvillons réalisés sur prépuce ou vessie. L'hémoculture, réalisée à partir du sang est considérée dans une classe à part au plan méthodologique, et traduit un envahissement systémique. (Infographie : S. Rossi, ONCFS)

3.6.3. Profils sérologiques après vaccination

Les résultats quantitatifs (index ELISA) ou semi-quantitatifs (Titre FC et score EAT) ont été analysés chez les animaux vaccinés entre J0 et J90. Les chèvres décédées avant J20 (10139 et 30313) ainsi que les animaux contacts ont été exclus de l'analyse. Pour chaque variable expliquée (index ELISA, titre FC et score EAT), un modèle mixte d'analyse de variance (R, instruction LMER du package lme4) a été appliqué en ajustant sur les facteurs pouvant influencer la réponse humorale :

- Effet aléatoire : animal
- Effets fixes : jours post-vaccination, détection d'une bactériémie à J20 (oui/non), espèce (CH/BQ)

4. RESULTATS

4.1. Vérification des vaccins

Après réception du lot 164164 du vaccin vivant atténué Ocurev® (CZ Veterinaria SA, Porriño, Espagne) utilisé dans l'expérimentation, le contrôle du lot a été réalisé par le Laboratoire National de Référence pour la Brucellose conformément aux exigences de l'OIE (Chapitre 2.1.4 du Manuel de l'OIE, 2016) et a été déclaré conforme suite aux résultats obtenus (**Tableau 4**).

Après vaccination des chèvres et des boucs le 6 février 2017, un flacon du vaccin Ocurev® a été conditionné au sein de la PFIE pour être transporté jusqu'au laboratoire L3 de l'unité de recherche INRA Infectiologie et santé Publique (ISP) pour à la fois une mise en conservation et la numération de l'inoculum. La dose vaccinale administrée par voie conjonctivale est une goutte de 35 µL renfermant 1 à 2.10⁹ UFC/mL. Aucun contaminant n'a été observé à J2 ni à J7. Le résultat de la numération est de 1,6.10⁹ UFC/35 µL. Le résultat est conforme au contrôle du lot réalisé pour le vaccin.

Tableau 4 : Synthèse des résultats du contrôle du lot 164164 du vaccin vivant atténué OCUREV® (CZ Veterinaria SA, Porriño, Espagne) utilisé dans l'expérimentation

Critère contrôlé	Résultats du fournisseur	Résultats ANSES
Pureté (coloration de Gram)	Cocobacille Gram négatif	Cocobacille Gram négatif
Phase de dissociation	< 5% formes R	< 5% formes R
Identification	<i>Brucella melitensis</i> 1 souche Rev.1	<i>Brucella melitensis</i> 1 souche Rev.1
Dénombrement	1 ,52. 10 ⁹ UFC /dose	1,3 – 1,62.10 ⁹ UFC /dose

4.2. Suivis cliniques et sanitaires

4.2.1. Signes clinique et lésions

- Bouquetins

En amont de la vaccination, le suivi clinique/vétérinaire des individus a permis d'identifier des parasitoses chez certains bouquetins, vraisemblablement suite au changement d'environnement. L'ensemble des animaux a été traité à l'aide d'un anthelminthique (Fenbendazole/Panacur®, MSD Animal Health, Merck & CO., Inc., Kenilworth, USA). En raison d'une diarrhée persistante chez une femelle, il a été décidé de ne pas procéder à la vaccination de cet individu (2349) à J0, qui a été de nouveau vermifugé après coproscopie et PCR BDV et intégré comme animal contact supplémentaire. Le protocole expérimental a donc porté sur 9 animaux vaccinés (5 mâles et 4 femelles) et 3 témoins « contact » (1 mâle identifié 1895 et 2 femelles, 2349 et 1926). Durant la durée de l'expérimentation, le suivi clinique des animaux a concerné des diarrhées épisodiques (un complément alimentaire protecteur gastro-intestinal de type Phoscargil® (San'Elevage, Changé, France) a été administré à l'ensemble des animaux). Aucune hyperthermie majeure, ni polypnée, tachycardie, prostration, anorexie, amaigrissement ou plaintes n'ont été

observées chez les animaux. Par ailleurs, aussi bien sur animal vivant que lors de l'autopsie, aucune lésion macroscopique évocatrice de brucellose (Freycon 2015) n'a été observée chez les animaux vaccinés ou contact, en particulier au niveau des organes génitaux, de la mamelle ou des articulations. Il n'a pas non plus été noté de perte d'appétit ou d'état corporel, de trauma, ni de comportements agressifs entre individus, en dépit de la promiscuité entre individus d'un même lot sur une durée prolongée de 3 mois. Ce résultat tient sans doute au savoir-faire des personnels de la Haute Touche et à l'adéquation des bâtiments réhabilités, avec en particulier, l'aménagement de grilles et de zones de refuges en hauteur adaptées à cette espèce.

- **Chèvres domestiques**

Aucun signe clinique n'a été observé suite à la mise en bâtiments (phase d'acclimatation) ni à la vaccination des chèvres, à part chez le bouc 62107 qui présentait à J5 de forts écoulements nasaux qui ont ensuite rétrocedé sans traitement. Néanmoins, trois morts sont à déplorer au sein du lot des cinq chèvres vaccinées, vraisemblablement en lien avec d'autres pathologies intercurrentes et un faible état corporel de ces dernières. Deux chèvres vaccinées (individus 10139 et 30313) ont été retrouvées mortes respectivement à J6 et J13 post-vaccination, sans signe clinique détecté. L'individu 30313, autopsié au LVD de Tours, présentait un état corporel très dégradé et des lésions évocatrices d'une dégénérescence séreuse de la graisse viscérale (œdème du sillon péricardique), pouvant avoir été causé par une paratuberculose chronique (forts titres en anticorps détectés en amont de l'expérimentation) qui dans cette espèce est classiquement associée à une perte de fonctionnalité de la muqueuse intestinale et une dénutrition, bien que l'animal s'alimente normalement et ne présente pas de diarrhée. Une 3^{ème} chèvre sur les 5 vaccinées (20055) a déclaré une mammite à J42 post-vaccination et a été euthanasiée à J43 pour des raisons de bien-être animal (points limites dépassés). L'examen nécropsique de cet animal a révélé, outre la mammite, la présence de lésions de pneumonie et un portage important en *Pasteurella* associé à un très mauvais état corporel. Ces pathologies peuvent être expliquées en partie par le fait que ces chèvres de réforme avaient été exposées à de multiples pathogènes durant leur carrière laitière. Bien qu'elles s'alimentaient normalement et n'exprimaient pas de signe clinique, leur état corporel s'est semble-t-il dégradé suite à la vaccination, peut-être en raison de la demande énergétique associée à la réponse immunitaire post-vaccinale (en particulier avec un vaccin vivant). Pour autant, chez aucun de ces 3 individus morts ou mourants au cours de l'expérimentation, il n'a été observé de lésion évocatrice de brucellose, ni de portage de *Brucella* dans les organes lésés mis en culture pour 2 des 3 individus. Il en est de même pour la totalité des autres individus qui ne présentaient pas non plus de lésions macroscopiques évocatrices de brucellose.

4.2.2. Numération sanguine

Outre une importante variabilité individuelle, nous avons pu constater que la NF variait en fonction du traitement (vaccinal/contact), de l'étape post-vaccination, de l'espèce et du sexe des animaux. Suite à vaccination, on constate une diminution de la concentration des globules blancs dans les deux espèces (**Figure 7**). Cette diminution peut s'expliquer par un stress post-vaccinal générant à la fois une

leucopénie et une réorganisation des globules blancs (Crosby *et al.*, 1984). En la matière, la réponse immunitaire varie sensiblement du bouquetin à la chèvre. Chez les bouquetins comme chez les chèvres domestiques, les femelles présentaient initialement plus de globules blancs que les mâles. Nous observons également un plus fort ratio initial entre lymphocytes et neutrophiles (L/N) chez les femelles bouquetins. Chez les bouquetins vaccinés, on observe un abaissement graduel, entre J0 et J68, du ratio L/N (donc en faveur des lymphocytes) correspondant, pour partie, à la multiplication de cellules productrices d'anticorps². Cette réponse est à la fois plus tardive et beaucoup marquée que chez les chèvres domestiques (**Figure 7,8**). Cette dynamique différenciée entre chèvres et bouquetins pourrait traduire des mécanismes de réponse immunitaire différents entre les deux espèces. La population plaquettaire des bouquetins comme des chèvres se trouve augmentée après vaccination, certainement en lien avec la stimulation vaccinale comme pour d'autres infections bactériennes (Dankert *et al.*, 2001). Au sein des deux espèces, on n'observe pas de variation de la concentration des hématies liée à la vaccination. En revanche, on note une tendance à la baisse de l'hématocrite des bouquetins au cours du temps, vaccinés ou non, qui pourrait s'expliquer par le changement d'altitude subi par les animaux issus du Parc des Angles (1650 m) et récemment introduits à la Haute Touche (110 m).

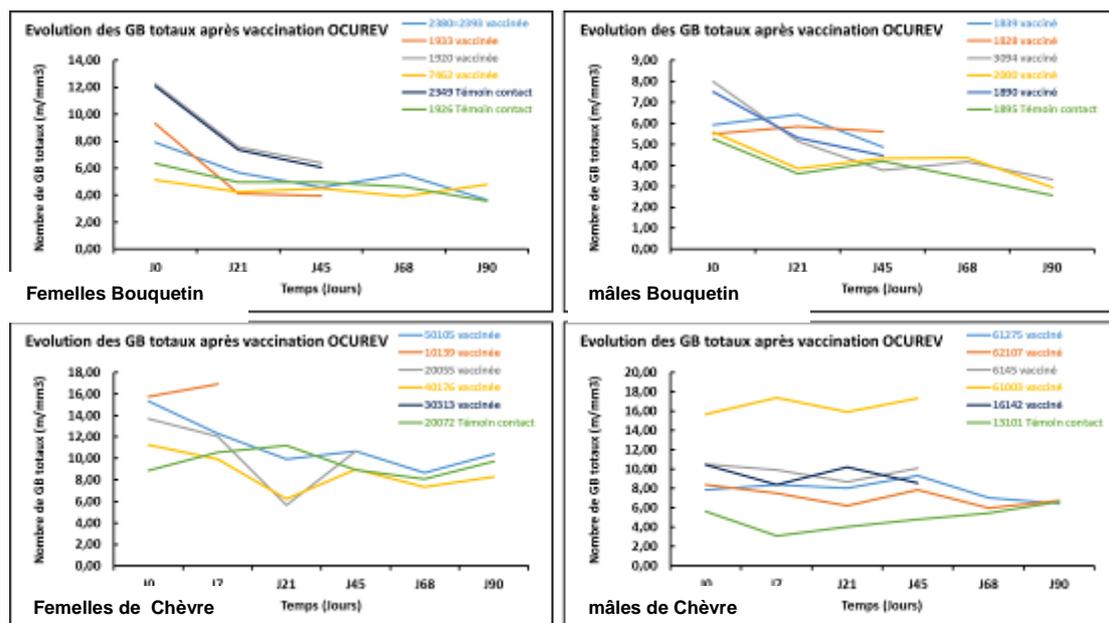


Figure 7 : Suivi des globules blancs post-vaccination OCUREV® chez le Bouquetin et la Chèvre domestique des deux sexes

² le bouquetin mâle témoin, contaminé durant l'expérience, exprime la même dynamique que les animaux vaccinés mais avec un décalage de ~45 jours.

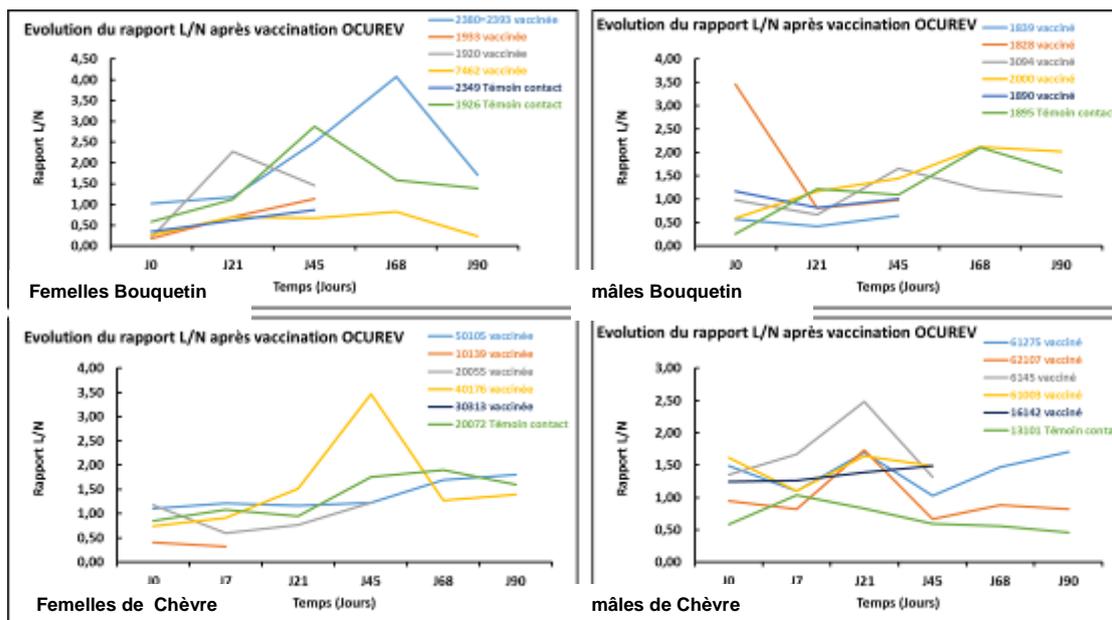


Figure 8: Suivi du rapport Neutrophiles/Lymphocytes (N/L) post-vaccination OCUREV® chez le Bouquetin et la Chèvre domestique des deux sexes

4.2.3. mesure des ROS

- Bouquetins

Chez les bouquetins vaccinés ou témoins, on observe de faibles variations dans les valeurs de ROS basal au cours de l'expérimentation en dépit du traitement vaccinal. Cette composante du système immunitaire innée (flambée oxydative) semble donc peu impliquée chez cette espèce dans la réponse immunitaire au traitement vaccinal (**Figure 9**). Concernant le ratio S/B, traduisant la capacité de réponse et le stress des animaux, on observe un léger infléchissement entre J0 et J20 chez les individus vaccinés, qui pourrait davantage correspondre à un « stress » de vaccination qu'à un « stress » de confinement (qui devrait concerner tous les individus). On observe également une augmentation significative de ce ratio chez tous les individus à J65 ($p < 0.001$), sans que l'on puisse relier cette reprise de réactivité des globules blancs à un événement particulier. On remarque quelques individus particuliers, notamment un niveau de ROS basal élevé et un Ratio S/B faible, traduisant une faible capacité de réponse immunitaire, chez une jeune femelle qui présentait une diarrhée aiguë à J0 et n'avait de ce fait pas été vaccinée (individu 2349), profil que l'on peut attribuer au « stress » causé par sa pathologie.

- Chèvres domestiques

Chez les chèvres domestiques, les valeurs de ROS basal apparaissent plus élevées que chez des bouquetins et semblent s'élever suite au traitement vaccinal (**Figure 10**). Mais, contrairement au bouquetin, le Ratio S/B (la capacité de réponse immunitaire) a plutôt tendance à s'élever post-vaccination et à ne pas dépendre du traitement vaccinal. Certains individus se démarquent, en particulier on note un ROS basal élevé associé à un Ratio S/B bas chez la chèvre « 20055 » qui présentait des signes cliniques aigus à J43 justifiant son euthanasie (mammite et affaiblissement).

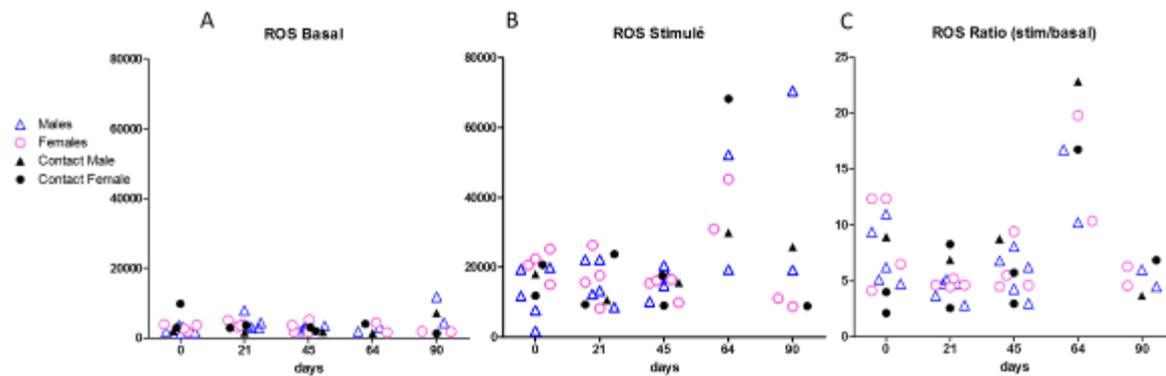


Figure 9. ROS chez les bouquetins. Evolution des niveaux de ROS basaux (A), après stimulation PMA (B) (unité arbitraire) et du ratio Stimulé/Basal (C) chez les bouquetins mâles (Δ) et femelles (\circ) après inoculation conjonctivale par OCUREV® et chez des animaux témoins (contact mâle \blacktriangle et femelles \bullet)

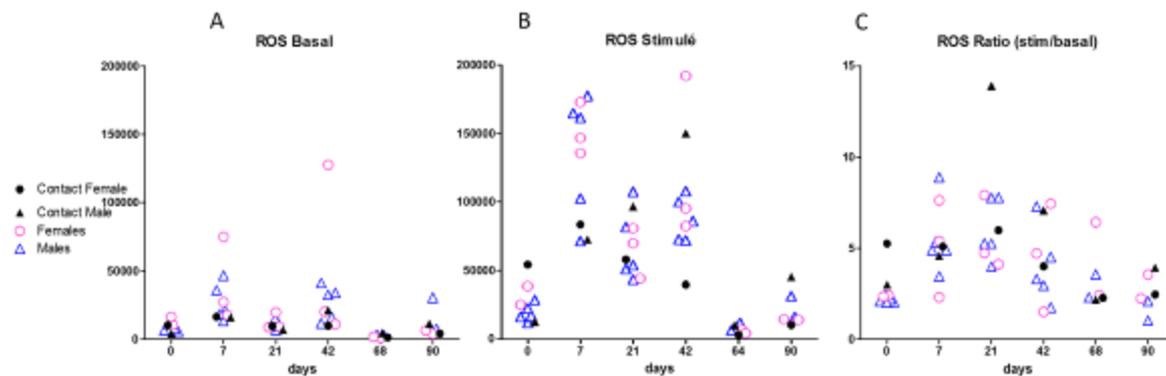


Figure 10. ROS chez les chèvres. Evolution des niveaux de ROS basaux (A), après stimulation PMA (B) (unité arbitraire) et du ratio Stimulé/Basal (C) chez le bouc (Δ) et la chèvre (\circ) après inoculation conjonctivale par OCUREV® et chez des animaux témoins (contact mâle \blacktriangle et femelle \bullet)

4.2.4. Suivis hormonaux

Trois femelles bouquetins (1926, 1933 et 7462 âgées de 5 ans et plus) étaient régulièrement cyclées (concentration de progestérone dans le sang comprise entre 1,3 et 10 ng/ml) durant l'expérimentation (période d'œstrus classique dans cette espèce). Une 4^{ème} femelle de 3 ans (1920) présentait une élévation faible de progestérone (1,3 ng/ml) à J45 pouvant correspondre à un premier fonctionnement cyclé de l'ovaire. Les deux autres femelles 2393 (vaccinée) et 2349 (témoin), âgées de 2,5 ans, étaient sexuellement immatures. L'ensemble des six chèvres domestiques, toutes âgées de plus de trois ans, étaient en revanche pubères et cyclées durant la période d'expérimentation. Les mâles étaient par ailleurs tous des individus pubères et non castrés (production de semence vérifiée chez les boucs, bouquetins mâles tous en âge de procréer). Au final, une majorité d'animaux étaient matures sexuellement et un seul individu vacciné était immature (femelle bouquetin).

4.3. Résultats sérologiques (immunité humorale = production d'anticorps)

4.3.1. Résultats qualitatifs observés au niveau de l'ensemble des animaux

Le **Tableau 5** résume les résultats sérologiques observés à l'échelle des animaux à chaque étape pour les deux tests réglementaires (EAT et FC) tels que précédemment définis. On constate que la totalité des animaux vaccinés a présenté une séroconversion dès 20 jours post-vaccination pour le test EAT. Tous les animaux vaccinés ont présenté une réaction sérologique positive à J45 pour les 2 tests, ainsi que pour le test ELISA indirect réalisé en complément des 2 tests réglementaires (**Tableau 6**). Puis, cette proportion a diminué entre J68 et J90 chez les chèvres (notamment avec l'apparition de résultats négatifs en FC pour cette espèce), alors que tous les bouquetins sont restés positifs pour ces deux tests jusqu'à J90. Il est à noter que l'ensemble des animaux vaccinés est resté positif en ELISA indirect jusqu'à J90. Les animaux contacts sont quant à eux restés séronégatifs pendant toute la durée de l'expérimentation, excepté le bouquetin mâle identifié 1895 ayant présenté une séroconversion à partir de J68 pour les 3 tests sérologiques réalisés (**Figure 11**).

Tableau 5 : Proportion d'animaux vaccinés présentant une réaction sérologique positive aux tests EAT et FC aux différents stades post-vaccination (J20, 45, 65, 90)

% EAT et FC positifs	J0	J20	J45	J65	J90
Bouquetins	0	9/9	9/9	4/4	4/4
Chèvres	0	6/8 ^a	8/8	2/4 ^b	1/4 ^c

^a 2 animaux négatifs en FC à J20, ^b 2 animaux négatifs en FC à J65, ^c 2 animaux négatifs en FC et 1 chèvre négative en EAT et FC à J90

Tableau 6 : Proportion d'animaux vaccinés présentant une réaction sérologique positive au test ELISA indirect aux différents stades post-vaccination (J20, 45, 65, 90)

% ELISA positifs	J0	J20	J45	J65	J90
Bouquetins	0	6/9	9/9	4/4	4/4
Chèvres	0	4/8	8/8	4/4	4/4

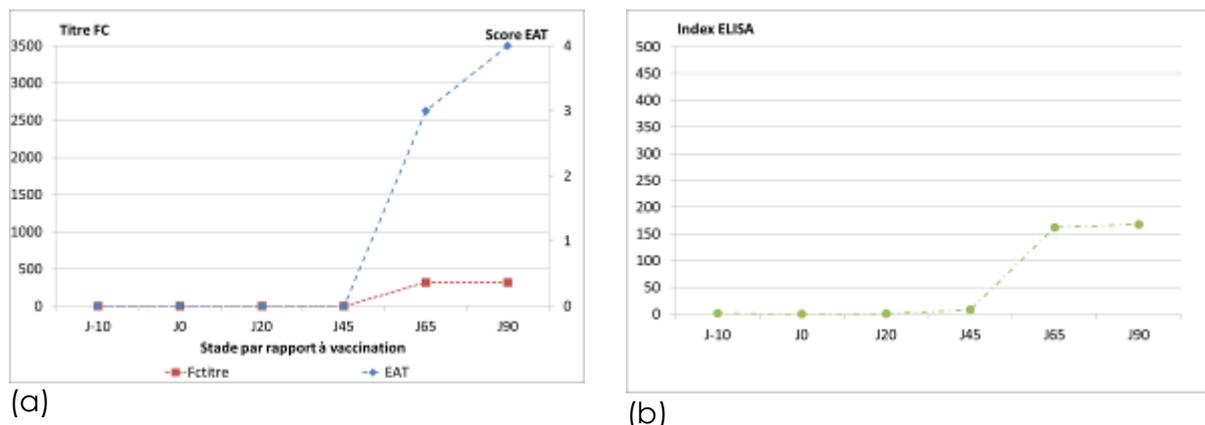


Figure 11 : Profil sérologique du bouquetin mâle N°1895 non vacciné ayant présenté une séroconversion au stade J65 de l'expérimentation détectée par : (a) tests EAT et FC ; (b) test ELISA indirect

4.3.1. Approche comparative quantitative

L'intensité de la réponse humorale a été estimée chez les animaux vaccinés des deux espèces à partir des résultats quantitatifs (index du test ELISA indirect) ou semi-quantitatifs (titre obtenu par FC et score d'agglutination de l'EAT). Le **tableau 7** résume les caractéristiques des modèles d'analyse de variance ainsi que les effets fixes associés à la réponse humorale. Il est à noter qu'aucun effet du sexe n'a été mis en évidence. L'effet du stade post-vaccinal influence significativement les profils sérologiques pour chacun des tests utilisés. Les profils obtenus entre J20 et J90 sont caractérisés par une augmentation significative des réponses dès J20 post-vaccination, les réponses positives maximales étant observées entre 20 et 68 jours post-vaccination, en fonction du test sérologique (J20 ou J45 pour et FC ; J45 ou J68 pour ELISA ; **Figure 12**). Puis, une diminution significative est observée à J90, plus ou moins marquée selon les tests et l'espèce, avec une nette variabilité individuelle et conduisant chez plusieurs chèvres à une séro-négativité dès J90 (**Figure 12**).

Un effet significatif de l'espèce a donc été observé pour les résultats semi-quantitatifs obtenus par FC (titre) et EAT (score), avec des réponses plus intenses et prolongées chez les bouquetins que chez les chèvres. La présence d'une bactériémie à J20, critère associé à la diffusion systémique de la bactérie n'est pas clairement associée à l'intensité de la réponse humorale. Le test ELISA indirect n'a pas mis en évidence de différence significative de cinétique entre les deux espèces, mais est considéré comme moins approprié que la FC pour apprécier l'intensité de la réponse humorale (le titre de la FC étant un proxy de la concentration en anticorps).

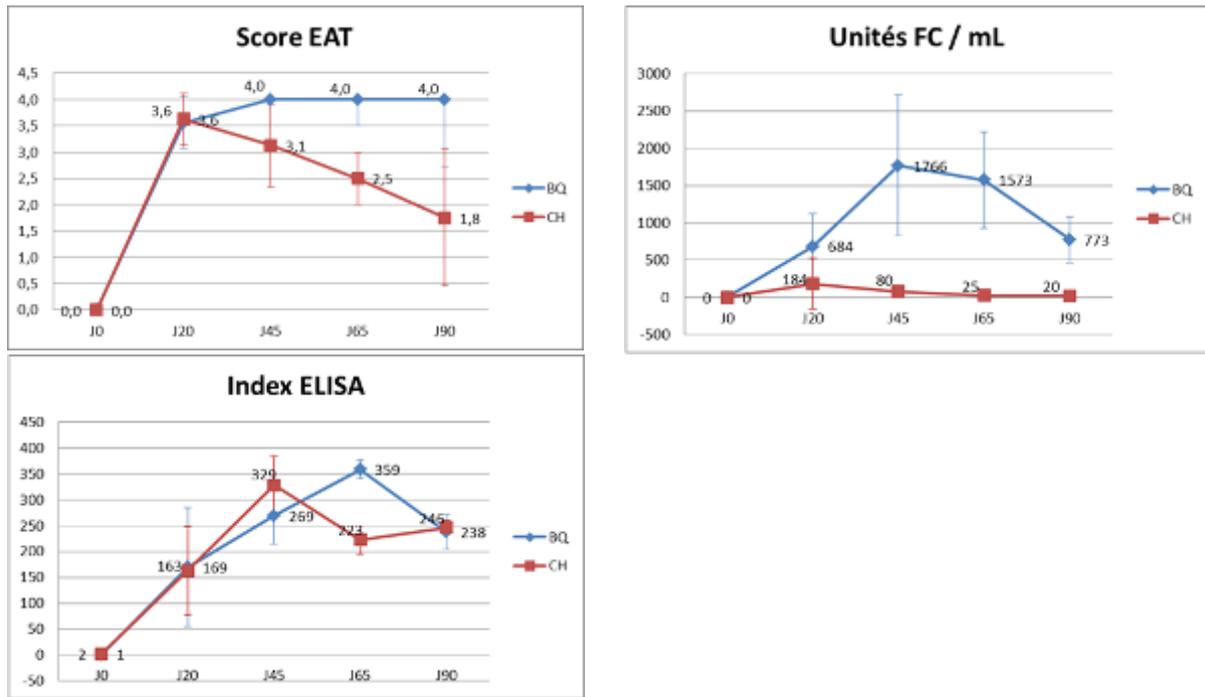


Figure 12 : Profils sérologiques observés chez les chèvres (CH) et bouquetins (BQ) vaccinés à J0 (moyenne +/- erreur type)

Tableau 7 : Caractéristiques des modèles d'analyse de variance de la réponse immunitaire humorale et effets fixes associés (NS=non significatif, $p > 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Variable expliquée	Unités FC / mL	Score EAT	Index ELISA
Jours p.v. (J0 = référence)			
J45	**	***	***
J65	***	***	***
J90	*	***	***
Espèce (CH vs BQ)	***	***	NS
Bactériémie à J20 (oui / non)	NS	***	NS
Sexe (M / F)	NS	NS	NS

4.4. Analyses bactériologiques

4.4.1. Résultats observés sur l'ensemble des animaux

Le **Tableau 8** résume les résultats des **375 examens bactériologiques** réalisés sur la totalité des 22 individus ayant survécu plus de 20 jours post-vaccination (ce qui exclut deux chèvres femelles mortes à J7 et J13), et dont 94 étaient positifs (au moins une colonie isolée sur 1 à 4 boîtes). Ce tableau tient compte des analyses réalisées sur la totalité des organes, écouvillons et fluides (y compris les hémocultures). A l'examen de ce tableau, on constate que la totalité des animaux vaccinés ont été colonisés par la souche vaccinale, tout au moins au niveau des NL de la tête. On constate également que le mâle de bouquetin contact (1895), qui avait séroconverti entre J45 et J65, présentait un nombre important d'organes positifs lors de son autopsie à J90. Si un écouvillon oculaire positif a été observé chez un bouc domestique à J20, ce sont 8 résultats d'écouvillons positifs qui ont été détectés à la même date chez les bouquetins mâles et femelles. D'autre part, un bouquetin mâle (2000) présentait un écouvillon préputial positif à J20 et J65, et, à l'autopsie à J45, on constate la présence de la souche vaccinale dans les urines d'un autre individu (1839). De telles positivités dans des organes ou fluides, marquant une excrétion de la souche vaccinale, ne sont plus observés à J90 chez aucun bouquetin ni chèvre domestique de notre échantillon, mais certains NL de la sphère-urogénitale restent infectés à cette date, le **tableau 9** rend compte de ces résultats positifs et des charges bactériennes correspondantes. Outre le bouquetin contact (1895), vraisemblablement infecté au milieu de l'expérimentation (et dont la charge très élevée correspond à celle des bouquetins autopsiés à J45), on constate que 3/4 des autres bouquetins et 2/4 des chèvres domestiques initialement vaccinés (à J0) sont encore porteurs de la bactérie à J90 dans l'un de ces nœuds lymphatiques. Les charges bactériennes apparaissent faibles chez deux femelles bouquetins (2393, 3094), mais non négligeables chez un mâle bouquetin (2000) et deux chèvres domestiques (40176, 50105) (**Tableau 9**). Enfin, il a été observé que la diffusion systémique de la bactérie, estimée par hémoculture ou culture directe sur leucocytes, aux différents stades post-vaccinaux, est également contrastée entre les 2 espèces. Détectée chez l'ensemble des bouquetins (mâles et femelles) à J20 après vaccination, une bactériémie n'a été détectée que chez 2 boucs (62107 et 61275) à ce même stade, un troisième bouc ayant présenté une bactériémie positive à J7 uniquement (06145). Aucune bactériémie n'a été détectée au-delà de 20 jours post-vaccination dans les 2 espèces.

4.4.2. Proportion d'organes infectés à l'échelle des individus vaccinés

Entre J20 et J90, on comptabilise 68 données au niveau individuel (individu*étape), dont 50 correspondant aux animaux vaccinés à J0 et 18 aux animaux témoins. La proportion d'organes infectés au niveau individuel a été ici analysée en utilisant ces 50 données collectées auprès de 17 animaux vaccinés ayant survécu entre J20 et J90 (9 bouquetins et 8 chèvres). Les modèles mixtes s'ajustant le mieux à ces données retiennent l'effet du type d'échantillonnage (*in vivo* vs autopsie), de l'étape (J20, J45, J65, J90), de l'espèce, et dans une moindre mesure de l'âge et du sexe des individus (**Tableau 10-A**). Par ailleurs, il n'a pas été possible de détecter

d'association entre le génotype des bouquetins vaccinés et le degré d'envahissement des organes dans notre échantillon ($p=0.888$, tests de Wald).

Chez les bouquetins, on observe un degré d'envahissement des organes beaucoup plus élevé que chez les chèvres domestiques ($OR_{ibex/goat}=4.206$, 95% CI [2.413 ; 7.334]). On observe, assez logiquement, une moindre proportion d'organes infectés lors d'écouvillonnages/prise de sang sur animaux vivants en comparaison des étapes d'autopsies où davantage d'organes ont été prélevés ($OR_{vivo/necropsy}=0.034$, 95% CI [0.004 ; 0.260]). Par ailleurs, la proportion d'organes infectés diminue au cours du temps chez les deux espèces ($OR_{J90/J20}=0.496$, 95% CI [0.266 ; 0.924]). Il n'a pas été possible de tester l'interaction entre l'espèce et l'étape sur ce jeu de données (problème de convergence) ; néanmoins, sur un plan descriptif, on ne constate pas de différentiel majeur dans la cinétique temporelle entre chèvre et bouquetin. Les effets de l'âge et du sexe n'étaient pas significatifs, tout au plus peut-on signaler une tendance à une distribution plus large de la bactérie chez les mâles bouquetins.

En se focalisant sur la proportion de prélèvements positifs dans la sphère uro-génitale (**Tableau 10-B**), on observe à nouveau un net sur-risque d'infection chez les bouquetins en regard des chèvres ($OR_{ibex/goat}=6.739$, 95% CI [1.968 ; 23.074]) et un logique effet du type d'échantillonnage en faveur des autopsies par rapport aux écouvillonnages ($OR_{vivo/necropsy}=0.155$, 95% CI [0.032 ; 0.745]). L'effet de l'étape post-vaccinale n'est en revanche pas significatif lorsqu'on se restreint à la sphère uro-génitale qui, comme indiquée plus haut, peut demeurer infectée au moins 90 jours au sein des deux espèces.

Tableau 10 : Meilleurs modèles relatifs à la proportion d'organes infectés à l'échelle des individus vaccinés entre J20 et J90 (hémocultures incluses). NA signifie « pas d'effet significatif » et + « inclusion de la variable », les modèles sont classés par ordre décroissant d'ajustement aux données, les meilleurs modèles ($\Delta AICc < 2$) sont indiqués en italique et en gras.

- **A- Sur l'ensemble des organes testés**

Age	Sexe	Espèce	Etape	Type (vivo/autopsie)	Df	logLik	AICc	Delta	Weight
							<i>117.1</i>		
NA	NA	+	+	+	7	50.2427731	5	0	0.54
							<i>117.9</i>		
NA	+	+	+	+	8	-49.206541	2	0.77	0.37
					1	-	122.1		
+	+	+	+	+	0	48.2328932	0	4.95	0.05
							122.1		
+	NA	+	+	+	9	49.8169467	3	4.98	0.04

- **B - Sur les organes de la sphère uro-génitale**

Age	Sexe	Espèce	Etape	Type (vivo/autopsie)	Df	logLik	AIC	Delta	weight
							<i>52.7</i>		
NA	NA	+	NA	+	4	22.3880602	8	0	0.47
							<i>54.4</i>		
+	NA	+	NA	+	6	-21.201312	0	1.62	0.21
NA	+	+	NA	+	5	-	54.7	1.99	0.17

					22.3865158	7			
+	+	+	NA	+	7	-21.169648	56.34	3.56	0.08
NA	NA	+	+	+	7	-21.3667741	56.73	3.95	0.06

Tableau 8 : Résultats des 375 examens bactériologiques (négatifs ou positifs) réalisés chez 22 individus ayant survécu jusqu'à J20 (17 vaccinés et 5 témoins). Les mâles des deux espèces sont indiqués en bleu sauf le mâle témoin bouquetin (1895) indiqué en rouge, les étapes J45 et J90 ayant donné lieu à des autopsies chez la moitié des individus (nombre d'examen >3) sont indiquées en rouge ; les cases colorées en gris foncé correspondent aux animaux euthanasiés à J45 et qui n'ont donc plus été échantillonnés par la suite.

						J20		J45		J68		J90		
Espèce	Traitement	Sexe	Age	Ident.	Génotype	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Total
Chèvre	Contact	F	>5 ans	20072		3	0	3	0	3	0	11		20
		M	3-5 ans	13101		3	0	3	0	3	0	11		20
	Vacciné	F	3-5 ans	40176		3	0	3	0	3	0	9	2	20
			<3 ans	50105		3	0	3	0	3	0	10	1	20
			>5 ans	20055*		3	0	6	5					14
		M	<3 ans	62107		2	1	3	0	3	0	9	2	20
			<3 ans	16142		3	0	7	4					14
			<3 ans	06145		3	0	6	5					14
			<3 ans	61003		3	0	8	3					14
			<3 ans	61275		3	0	3	0	3	0	10	1	20
Bouquetin	Contact	F	<3 ans	2349***	A324-A330	3	0	9	0					12
			3-5 ans	1926	A324-A330	3	0	3	0	3	0	11		20
		M	3-5 ans	1895**	A330-A330	3	0	3	0	3	0	5	6	20
	Vacciné	F	<3 ans	2393***	A324-A330	3	0	3	0	3	0	6	4	19
			>5 ans	7462	A324-A324	3	0	3	0	3	0	5	6	20
			<3 ans	1920	A324-A330	3	0	4	6					13
			3-5 ans	1933	A324-A330	2	1	4	6					13
		M	3-5 ans	1890	A324-A330	2	1	4	7					14
			3-5 ans	2000	A324-A324	1	2	3	0	2	1	5	6	20
			3-5 ans	1839	A330-A330	1	2	4	7					14
			<3 ans	1828	A330-A330	3	0	5	6					14
<3 ans	3094	A324-A330	1	2	2	1	3	0	5	6	20			
Total						57	9	92	50	35	1	97	34	375

* chèvre vaccinée malade et euthanasiée à J43

** bouquetin mâle témoin ayant séroconverti entre J45 et J68 *** femelles bouquetins impubères

Tableau 9 : Détail des résultats positifs observés sur des nœuds lymphatiques de la sphère uro-génitale à J90 : iliaques (deux sexes), inguinaux (mâles) ou rétro-mammaires (femelles).

Espèce	Ident.	organes	Boites nombre	Colonies nombre	Moyenne par boîte	Sexe	Age	traitement
Bouquetins	2393	NL_IngMam	4	1	0.25	F	<3 ans	vaccine
	3094	NL_IngMam	4	1	0.25	M	<3 ans	vaccine
	3094	NL_Iliaq	4	6	1.5	M	<3 ans	vaccine
	2000	NL_IngMam	4	106	26.5	M	3-5 ans	vaccine
	2000	NL_Iliaq	4	136	34	M	3-5 ans	vaccine
	<i>1895**</i>	<i>NL_IngMam</i>	<i>3</i>	<i>900</i>	<i>300</i>	<i>M</i>	<i>3-5 ans</i>	<i>contact</i>
<i>1895**</i>	<i>NL_Iliaq</i>	<i>4</i>	<i>444</i>	<i>111</i>	<i>M</i>	<i>3-5 ans</i>	<i>contact</i>	
Chèvres	40176	NL_IngMam	4	20	5	F	3-5 ans	vaccine
	50105	NL_IngMam	4	39	9.75	F	<3 ans	vaccine

** Le mâle témoin, 1895, doit être considéré à part, son infection étant survenue à mi-expérimentation, sa charge bactérienne correspond à celle observée chez les bouquetins autopsiés à J45.

4.4.3. Charge bactérienne à l'échelle des organes infectés

A l'échelle des organes infectés, en se focalisant sur les autopsies réalisées à J45 et J90 (hors hémocultures³), on totalise 283 recherches bactériennes, dont 208 correspondent à des animaux vaccinés, et parmi lesquels 78 se sont avérés positives pour la souche Rev.1 (c.à-d., au moins une colonie observée sur l'une des boîtes ensemencées, puis typage confirmé par le LNR). Sur les 78 organes positifs, les modèles les mieux ajustés aux données observées (**Tableau 11**) confirment que la charge bactérienne des organes est corrélée à l'espèce, au temps écoulé post-vaccination et à la classe d'excrétion telle que définie au paragraphe 3 et à la **Figure 6** : Ex_head pour excrétion au niveau de la tête, Ex_urogenit pour excrétion uro-génitale, NL_head pour les NL de la tête, NL_urogenit pour les NL de la sphère uro-génitale. On observe également une interaction entre l'espèce et l'étape post-vaccinale (**Tableau 11**).

Parmi les organes positifs en culture, les bouquetins présentaient des charges bactériennes initiales environ 10 fois plus élevées que celles des chèvres sur une échelle brute (**Delta_{libex/goat}⁴=+2.968**, 95% CI [+1.874 ;+4.061]) (**Figure 13**). Il faut en outre noter que les valeurs maximales observées chez les bouquetins ont été tronquées, les charges bactériennes n'ayant pas pu être dénombrées au-delà de 300 colonies. Après les premières autopsies, une baisse de la charge bactérienne est observée entre J45 et J90, diminution alors plus marquée chez les bouquetins (**Delta_{J90/J45ibsex}=-1.883**, 95% CI [-0.071 ; -3.695]), cette tendance à la baisse entre J45 et J90 ne ressortant pas de façon significative chez la chèvre, sans doute en raison de valeurs de charge beaucoup plus faibles dans cette espèce (p=0.163). A J90, les charges ne sont plus significativement différentes entre espèces, mais toujours différentes entre organes et individus. Dans tous les cas, les écouvillons de la tête présentaient des charges beaucoup moins élevées que le reste des organes testés (**Delta_{EXhead/EXurogenit}=-5.061**, 95% CI [-1.739 ; -8.384]). A noter que les urines ont été testées après centrifugation, et que leur niveau de charge bactérienne initial était certainement plus faible que celui des autres organes prélevés. L'âge n'avait pas d'effet significatif sur l'ensemble des deux meilleurs modèles, même si on observe une charge bactérienne un peu plus forte chez les animaux de plus de 2 ans par rapport aux plus jeunes (c.à-d., animaux sexuellement matures).

Tableau 11 : Meilleurs modèles relatifs à la charge bactérienne à l'échelle des 78 organes infectés à J45 ou J90 (hémocultures non incluses). Le nombre de colonies bactériennes a subi une transformation logarithmique. Les meilleurs modèles sont indiqués en italique et en gras.

Age	Excrétion	Sexe	Espèce	Etape	Espèce* étape	df	logLik	AIC	Delta	weight
						<i>1</i>	<i>-</i>	<i>262.0</i>		
+	+	NA	+	+	+	<i>1</i>	<i>120.03</i>	<i>7</i>	<i>0</i>	<i>0.56</i>
						<i>1</i>	<i>-</i>	<i>264.0</i>		
+	+	+	+	+	+	<i>2</i>	<i>120.01</i>	<i>2</i>	<i>1.95</i>	<i>0.21</i>
NA	+	NA	+	+	+	9	-123.69	265.3	3.32	0.10

³ Les hémocultures réalisées par l'Anses ne font pas l'objet de la même technique de culture bactérienne que le reste des examens bactériologiques, aussi, la présence étude de la charge bactérienne ne porte donc que les organes, nœud lymphatiques et écouvillons traités par le LVD de Touraine.

⁴ Attention les données relative aux charges bactériennes ont été log-transformées

								9	
								266.3	
+	+	NA	+	+	NA	0	-123.15	1	4.24 0.07
						1		266.8	
NA	+	+	+	+	+	0	-123.44	8	4.81 0.05

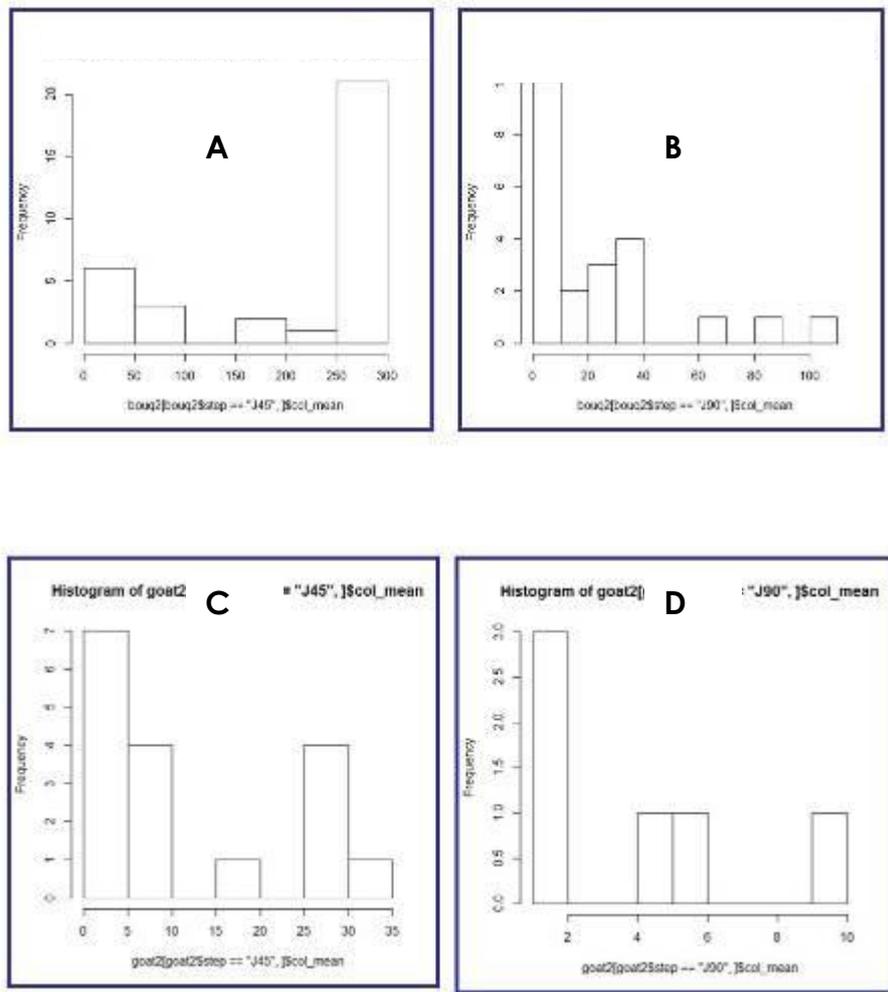


Figure 13 : Distribution des charges bactériennes moyennes observées à J45 et J90 à l'échelle des 78 organes infectés à J45 (A, C) ou J90 (B, D), hémocultures non incluses, chez les Bouquetins (A,B) et les chèvres (C,D). Les charges n'ont pas été log-transformées, mais le nombre de colonies est ici divisé par le nombre de boites.

5. DISCUSSION

La forte proximité phylogénétique entre la chèvre et le bouquetin, ainsi que le large recul sur l'utilisation du vaccin Rev.1 chez la chèvre et le mouton domestiques, avaient conduit un précédent groupe d'experts à envisager l'utilisation le vaccin Rev.1, à la dose préconisée pour les petits ruminants ($0,5-2 \times 10^9$ UFC) chez le bouquetin hors RCP⁵, selon le principe de la cascade, en respectant les règles de biosécurité d'usage pour le manipulateur (Anses 2015, Anses et ONCFS 2016). Néanmoins, il avait été recommandé, en préalable à toute éventuelle campagne de vaccination, de conduire, *a minima*, des expérimentations destinées à vérifier la sensibilité du bouquetin des Alpes (mâles et femelles aux différents âges et stades physiologiques) à la souche Rev.1 en partant des modes d'administration privilégiant l'innocuité (voie conjonctivale), sachant qu'il n'est pas possible d'extrapoler *a priori* les réponses immunitaires d'une espèce à une autre, même lorsqu'elles sont proches (Anses et ONCFS 2016). A titre d'exemple, la réduction de la dose vaccinale testée par voie conjonctivale chez la chèvre et la brebis par Zundel *et al.*, (1992) n'a pas eu le même effet sur la protection conférée par le vaccin (réduction des avortements après challenge post-vaccinal) chez ces deux espèces. Cette remarque est encore plus valable lorsqu'il s'agit d'extrapoler l'usage d'un vaccin vivant à une espèce sauvage non contrôlée par l'Homme et n'ayant pas co-évolué au contact des pathogènes du bétail (National Academies Of Sciences 2017). Cette étude s'est focalisée sur la comparaison interspécifique de la distribution de la souche vaccinale, de son excrétion et de la réponse immunitaire humorale. Pour des raisons réglementaires, techniques et éthiques précédemment développées lors de l'AST de 2016, il n'a pas été possible de réaliser un test d'innocuité clinique chez des femelles gestantes, ni un test d'efficacité vaccinale, nécessitant la réalisation d'une épreuve virulente. En effet, de tels tests supposeraient la disponibilité d'un environnement hautement confiné, adapté au bien-être des bouquetins et aux forts risques d'avortement brucellique et d'excrétion associée.

5.1. Interprétation des résultats de l'expérimentation

Les résultats de cette étude sont concluants dans la mesure où tous les animaux vaccinés ont séroconverti et ont montré un résultat positif en culture bactérienne au niveau locorégional, comme cela est attendu lors d'une vaccination Rev.1 réussie. Par ailleurs, aucun des animaux vaccinés n'a développé de lésion, ni de signe clinique imputable à la souche vaccinale (contexte hors gestation et avortement brucellique). Si l'on se réfère aux études de vaccination conduites par voie conjonctivale chez les caprins domestiques dans le passé, qu'ils soient pré-pubères (Fensterbank *et al.*, 1987) ou adultes (Zundel *et al.*, 1992 ; pour revue Blasco, 1997), il apparaît que l'absence de signes cliniques généraux (hyperthermie) est en accord avec les résultats expérimentaux rapportés dans la bibliographie. L'expérimentation est donc un succès dans sa mise en œuvre. Toutefois, les principaux résultats en termes de réaction immunitaire humorale (production d'anticorps spécifiques) et de

⁵ RCP : Résumé des caractéristiques du produit. Annexe de la décision d'autorisation de mise sur le marché (AMM) synthétisant les informations notamment sur les indications thérapeutiques, contre-indications, modalités d'utilisation et les effets indésirables d'un médicament. Cette information est plus particulièrement destinée aux professionnels de Santé. (Art. R.5128-2 du Code de la Santé Publique).

distribution de la souche vaccinale sont très contrastés entre les deux espèces et il convient de les discuter en détails.

5.1.1. Cohérence du modèle domestique (Chèvre) avec la littérature

- Réaction immunitaire humorale

Brucella étant une bactérie intracellulaire facultative, elle stimule l'immunité cellulaire comme l'immunité humorale. L'apparition des anticorps dans le sérum des ruminants implique une réponse T-dépendante, stimulée par le lipopolysaccharide bactérien de type lisse (S-LPS) de *Brucella melitensis*. Cette réponse humorale inclut des immunoglobulines (Ig) de type M, G₁, G₂ et de faibles quantités d'IgA, les IgG₁ dominant dans les 2-3 premières semaines post-vaccinales. L'augmentation des IgG₁ est rapide, dès 4 et 7 jours post-vaccination chez les animaux jeunes et adultes respectivement, ce qui implique que la détection précoce de la réponse humorale soit largement basée sur les IgG (pour revue, Ducrotoy *et al.*, 2016). Les profils sérologiques observés chez les caprins (séroconversion dans le mois suivant la vaccination, puis réduction de la réponse immunitaire humorale jusqu'à J90) sont cohérents avec ceux décrits dans la littérature, puisque 100 % des caprins vaccinés ont présenté une séroconversion (résultats EAT et FC positifs) au stade J45, suivie d'une diminution progressive des anticorps, associée à un taux de séropositivité égal à 50 % et 25 %, respectivement 65 et 90 jours post-vaccination. Ces proportions sont cohérentes avec celles décrites par Fensterbank *et al.* (1987) chez un groupe de 15 chevrettes (vaccinées par voie conjonctivale à l'âge de 4 mois), qui rapporte 100 % de séroconversion à 1 mois post-vaccination, et observe par ailleurs que l'ensemble des chevrettes a recouvré un statut séronégatif 4 mois post-vaccination.

En règle générale, la réponse humorale est plus marquée chez les animaux adultes que chez les animaux pré-pubères (pour revue, Blasco, 1997 ; Ducrotoy *et al.*, 2016). Cette situation est d'ailleurs exacerbée dans le cas où des femelles gestantes sont vaccinées : les résultats expérimentaux de Zundel *et al.*, (1992) ont montré que différentes doses vaccinales de Rev.1 chez 23 chèvres adultes (3 à 5 ans) gestantes, peuvent conduire à des avortements dans le mois suivant la vaccination et à la persistance des anticorps pendant plus de 6 mois chez plusieurs animaux. Pour la présente expérimentation, il avait été choisi de vérifier que l'innocuité est équivalente chez le Bouquetin des Alpes et la Chèvre domestique à un stade sexuellement mature (hors gestation), car c'est la classe d'âge la plus communément capturée dans la nature, sur le site du Bargy (Marchand *et al.*, 2016).

Une question soulevée par les profils sérologiques des chèvres et boucs vaccinés concerne la proportion de résultats sérologiques positifs obtenus par le test ELISA indirect, plus élevée que celle estimée par EAT et FC en fin d'expérimentation et persistant jusqu'à J90. Ce résultat peut s'expliquer par des différences de sensibilité et de spécificité diagnostiques des différents tests. Chez les petits ruminants, une meilleure sensibilité de l'ELISA indirect a été rapportée lors des comparaisons avec l'EAT et/ou la FC (Nielsen *et al.*, 2004 ; Rahman *et al.*, 2013). Des variations de ces performances ont par ailleurs été décrites selon le délai d'utilisation post-vaccination par Stournara *et al.*, (2007) chez des brebis vaccinées par Rev.1 à l'âge adulte ou plus jeunes. Ainsi, dans cette étude, la plupart des animaux ont été détectés séropositifs par EAT et FC dès 21 jours après vaccination, alors que les réactions

positives ont été détectées à 42 jours par ELISA indirect. Pour les animaux adultes, ces auteurs considèrent que les performances des tests sont équivalentes 4 mois après vaccination, mais ils rapportent des défauts de spécificité du test ELISA indirect utilisé plus tardivement après vaccination (11 mois). Enfin, les résultats des tests sérologiques, et notamment ELISA nécessitent d'être interprétés en fonction des contextes géographique et épidémiologique, des caractéristiques des populations testées, du type de kit utilisé, ce qui peut conduire à réviser les seuils de positivité en fonction de ces différents aspects (Nielsen *et al.*, 2004 ; Praud *et al.*, 2012 ; Rahman *et al.*, 2013).

- **Distribution de la bactérie**

Un autre point de discussion concerne la distribution et la persistance de la souche vaccinale au cours de l'expérimentation dans l'espèce *Capra hircus* : plusieurs résultats de bactériologie semblent plus marqués que ceux rapportés dans la littérature, notamment une bactériémie qui a été détectée chez 2 boucs à 20 jours post-vaccination et une clairance bactérienne dans les tissus de la sphère mammaire et génitale non complétée à 90 jours post-vaccination chez deux femelles. Bien que des bactériémies fugaces et précoces aient été rapportées lors des premiers essais de vaccination réalisés chez des chèvres vaccinées par voie sous-cutanée, il est admis que les réactions systémiques restent limitées suite à la vaccination (Elberg et Faunce, 1957 ; Elberg, 1959). L'état général des chèvres femelles incluses dans cette expérimentation pourrait en partie avoir contribué à la plus large colonisation bactérienne observée au cours de cette expérimentation, en particulier dans les NL de la sphère urogénitale. Notre lot était en effet composé de femelles de réforme, âgées et présentant un statut sanitaire chargé. Pour les deux chèvres positives en culture dans les NL rétro mammaires à J90, le statut sanitaire était le suivant : la chèvre 50105 était séropositive en fièvre Q et la chèvre 40176 était séropositive en paratuberculose. Par ailleurs, deux chèvres femelles de ce même lot sont décédées en cours d'expérimentation, ce qui pourrait renforcer l'hypothèse du moindre état général et compétence immunitaire de ce lot, et par conséquent, d'une sensibilité accrue à un stress post-vaccinal. Pour autant, ces accidents individuels ne remettent pas en question les différences marquées que nous avons pu observer entre les deux espèces, les chèvres décédées ayant été retirées de l'analyse.

5.1.2. Réponse au vaccin du Bouquetin des Alpes et différences interspécifiques

- **Réaction immunitaire humorale**

Un résultat important de cette expérimentation concerne l'intensité de la réaction immunitaire très contrastée entre les deux espèces. La réponse humorale a présenté une intensité plus marquée et prolongée chez le Bouquetin des Alpes par comparaison à la Chèvre domestique pour les tests sérologiques EAT et FC, la positivité persistant chez tous les bouquetins jusqu'à la fin de l'expérimentation. Cette tendance s'observe également au niveau de la cinétique des cellules blanches par une augmentation de la production de lymphocytes au détriment des neutrophiles plus tardive, plus intense et durable chez les bouquetins en comparaison des chèvres domestiques. Le développement de la réponse immunitaire à une infection brucellique n'est pas beaucoup documenté chez le

bouquetin, la présente expérimentation représentant à notre connaissance la 1^{ère} observation d'un suivi longitudinal de séroconversion sur cette espèce suite à contact avec une *B. melitensis* et sur une durée de 3 mois (atténuée vaccinale). Cependant, il apparaît que dans la population du Bargy, où la surveillance s'opère via l'analyse de la séroprévalence (Hars *et al.*, 2015, Marchand *et al.*, 2016), la réponse sérologique des bouquetins à la brucellose souche sauvage soit également très marquée et accompagnée de titres très élevés en fixation du complément, inédits en regard de ceux habituellement développés par les ruminants domestiques (Sophie Rossi et Bruno Garin-Bastuji comm. Pers.).

En dépit de cette réponse immunitaire en apparence plus forte, le Bouquetin est pourtant beaucoup moins efficace que la Chèvre à contenir la multiplication de cette souche bactérienne intracellulaire (vis-à-vis de laquelle les anticorps sont probablement inefficaces). Aussi nous émettons l'hypothèse du caractère « naïf » de la réponse immunitaire de cette espèce sauvage, ce qui est peut-être à mettre en rapport avec le fait que, contrairement aux espèces domestiques, cette espèce sauvage n'a pas co-évolué avec la brucellose.

- **Distribution de la bactérie**

La proportion d'organes infectés, en particulier au niveau urogénital, s'est avérée beaucoup plus élevée chez les bouquetins que chez les caprins domestiques. De même, la bactériémie détectée systématiquement à J20 chez les bouquetins renforce l'hypothèse d'une diffusion systémique plus marquée dans cette espèce par comparaison à la Chèvre domestique. Au sein des organes infectés, la charge bactérienne à J45 était très supérieure chez les bouquetins en comparaison des chèvres et ce, d'autant plus que les valeurs maximales des dénombrements ont été tronquées à 300 colonies / boîte. Néanmoins, à J90 les charges étaient modérées à faibles dans les deux espèces, avec une nette variabilité inter-individus notamment dans l'espèce Bouquetin (pas de différence statistique mise en évidence entre espèces à J90). Dans cette expérimentation, bien que des variations individuelles demeurent, l'effet de l'espèce sur la distribution de la souche vaccinale apparaît comme majeur en comparaison d'effets individuels peu ou pas significatifs (âge, sexe, génétique, état clinique)⁶.

En 1^{er} lieu ce résultat est à rapprocher du tableau lésionnel/anatomopathologique exacerbé exprimé historiquement par les ongulés de montagne vis-à-vis de la brucellose (Garin-Bastuji *et al.*, 1990, Ferroglio *et al.*, 1998) et plus particulièrement par le bouquetin des Alpes vis-à-vis de la souche sauvage *B. melitensis* biovar 3 présente dans la population du Bargy (Freycon 2015). L'ensemble de ces résultats confirme la plus grande sensibilité de l'espèce *Capra ibex* comparativement aux ongulés domestiques à la brucellose. Ce résultat fait aussi écho aux différences de réponse constatées historiquement entre le Bison d'Amérique (*Bison bison*), le Wapiti (*Cervus canadensis*) et la Vache domestique (*Bos taurus*) vis-à-vis des vaccins atténués de la souche *B. abortus* B19 et RB51, et des longs essais-échecs subis par le gestionnaire du Parc de Yellowstone vis-à-vis de la vaccination des espèces sauvages (Anses 2015, national Academies Of Sciences 2017). On peut notamment rappeler la distribution plus large et prolongée des souches vaccinales RB51 (Olsen

⁶ Bien entendu il n'est pas exclu que ces variables individuelles auraient eu un effet détectable sur un échantillon de plus grande taille, mais tout au moins, dans le cadre de notre étude, nous retenons les variations de réponse entre individus n'ont pas empêché d'étudier les variations interspécifiques.

et al., 1997 ; Olsen et al., 1998 ; Olsen, 2000) et de *B. abortus* virulente (Olsen et Johnsen, 2011) dans les tissus lymphatiques et utérins du Bison d'Amérique par rapport à la Vache domestique. Les vaccins anti-brucelliques utilisés chez les bovins domestiques sont par ailleurs associés à un taux très élevé et variable d'avortement post-vaccinal pour une protection très partielle chez le Bison d'Amérique, ce qui a fortement compromis leur utilisation en nature dans cette espèce (national Academies Of Sciences 2017). Plus largement, les résultats de notre étude sont à rapprocher de la plus grande sensibilité de certaines espèces sauvages « naïves » vis-à-vis d'agents pathogènes avec lesquels elles n'ont pas eu la possibilité de co-évoluer (Aguirre et Starkey 1994).

Au sein des bouquetins mâles vaccinés, une excrétion urogénitale a été détectée à J20 et J45 chez deux animaux sur cinq ; une telle excrétion n'a pas été observée dans les autres lots de chèvres ou de bouquetins femelles (non gestantes). On a par ailleurs pu constater la transmission de la souche vaccinale au mâle contact, lequel a séroconverti entre J45 et J68, transmission à mettre très probablement en rapport avec l'excrétion urogénitale chez deux mâles vaccinés mentionnée précédemment. Lors de son autopsie à J90, ce mâle contact présentait la même distribution et charge bactérienne que les bouquetins mâles vaccinés à J45 post-vaccination. Cet animal a présenté une séroconversion et une infection plus tardives, reproduisant entre J68 et J90 le même type de réponse que celle développée entre J20 et J45 par les bouquetins initialement vaccinés. Le caractère « décalé » de cette infection survenue dans la 2^{ème} moitié de l'expérimentation, suggère davantage une contamination de cet animal témoin via une contamination environnementale consécutive à l'excrétion urogénitale (urinaire et/ou préputiale) de ses congénères que consécutive à une excrétion immédiate post-vaccinale et des contacts directs entre ces animaux. La promiscuité des bouquetins mâles en confinement (80 m² par lot, changement de litière limité pour des raisons de gestion des effluents et de biosécurité) a pu favoriser dans notre cas la transmission de la souche vaccinale, que ce soit par voie directe ou indirecte. Compte tenu de la plus faible promiscuité *in natura* entre animaux et la sans doute plus faible persistance des *Brucella* excrétées dans les urines en montagne (pas de support organique, rapide désactivation par les UV et dessiccation, plus faible survie de la souche Rev.1 comparativement aux souches sauvages de *Brucella*), le groupe d'experts de cette étude considère que ce mode de contamination via une excrétion urogénitale et une contamination environnementale serait sans doute moins probable *in natura*. A contrario, le cadre de l'expérimentation était restrictif puisqu'il excluait les contacts inter-sexes, et donc les accouplements et le risque de gestation/avortement post-vaccinal ; dans un cadre naturel moins contraint, on peut supposer la survenue de transmissions sexuelles lors du rut entre mâles vaccinés excréteurs et femelles sensibles. On peut également supposer, du fait de l'envahissement des NL de la sphère uro-génitale chez les femelles bouquetins, la possibilité d'avortement brucellique chez les étagnes et d'excrétion de la souche vaccinale, à un niveau au moins égal à ce que l'on observe pour les espèces domestiques (*a priori* moins sensibles au vu de nos résultats) (Anses 2015, Anses et ONCFS 2016).

Alors que la proportion d'organes infectés diminue significativement entre J45 et J90, signe rassurant d'une cinétique vaccinale, on constate à J90 une persistance de la souche vaccinale dans les NL de la sphère urogénitale, associée à des charges modérées à faibles chez trois bouquetins sur quatre et chez deux chèvres sur quatre

vaccinées à J0. Ces résultats diffèrent fortement de ce que l'on pouvait attendre en se basant sur le modèle ovin domestique, chez lequel la souche Rev.1 n'envahit pas durablement la sphère urogénitale des mâles ni des femelles non gestantes et disparaît des organes avant J90 (Muñoz *et al.*, 2008). A cette difficulté d'extrapolation de nos résultats en lien avec la littérature, s'ajoute la prudence à apporter à des résultats basés sur le nombre limité d'animaux suivis dans chaque espèce à J90, et aux variations entre individus. Sur la base de ces résultats, nous sommes donc en mesure de pointer les différences entre espèces au cours des 3 mois suivant la vaccination, mais il nous est difficile de conclure quant aux possibilités d'élimination ou de persistance voire de ré-excrétion ultérieure de la souche vaccinale chez le bouquetin.

5.2. Conséquence pour l'utilisation du vaccin en nature

5.2.1. Conséquence pour la gestion/surveillance du foyer sauvage du Bargy

Concernant l'utilisation du vaccin sur le terrain, il convient de rappeler que, sur un plan opérationnel, la capture des bouquetins conditionne leur vaccination *in natura*. Or la mise en œuvre de captures pour cette espèce est principalement possible entre fin avril et début juin, soit au cours du 2^{ème} tiers de gestation des femelles bouquetins ce qui représente un risque élevé d'avortement post-vaccinal ; pour les captures réalisées en septembre-octobre (plus faibles effectifs), la période se situe deux mois avant le rut, représentant un risque potentiel de transmission vénérienne de la souche vaccinale. Les contraintes techniques liées à la capture de cette espèce sauvage en milieu montagnard, associées au risque d'excrétion observé au cours des deux mois suivant la vaccination des bouquetins (résultats de notre présente étude), ne permettent donc pas d'écarter un risque de diffusion intra-spécifique de la souche vaccinale. En effet, la période la plus probable d'excrétion de la souche vaccinale Rev.1 se situe entre J20 et J68 après vaccination chez le Bouquetin d'après les résultats de cette expérimentation. Dans le cas où le statut physiologique des femelles (gestante ou non) n'est pas déterminé avant vaccination, il n'est pas possible d'exclure la vaccination de femelles gestantes, notamment lors des captures de printemps, ce qui correspond au pire scénario en matière de diffusion de la souche vaccinale dans l'environnement. Il convient à ce titre de rappeler qu'à ce jour aucun test rapide n'existe qui permettrait un diagnostic de gestation au chevet de l'animal, la seule solution actuellement disponible consistant en une échographie qui est difficilement applicable dans les conditions du terrain. Dans ce cas, la survenue d'avortements et/ou la contamination des jeunes via le lait maternel seraient inévitables lors d'un déploiement vaccinal. De même, pour les mâles, il faudrait idéalement éviter que la période potentielle d'excrétion préputiale et/ou urinaire ne coïncide avec la période du rut, correspondant donc à une vaccination au cours des deux à trois mois que le précèdent (septembre-octobre). Au cours de la période de rut, les animaux mâles sont amenés à se déplacer au sein du massif du Bargy et multiplient les contacts avec leurs congénères femelles (Marchand *et al.*, 2016, Marchand *et al.*, soumis), pouvant aboutir à des cas de transmission vénérienne, même si cette voie n'est sans doute pas la voie prédominante de transmission de la brucellose chez le bouquetin du Bargy (Anses 2015, Marchand *et al.*, 2016, Marchand *et al.*, soumis).

Un des principaux problèmes de l'utilisation de la vaccination chez les ruminants est l'impossibilité de faire la différence par sérologie entre des animaux positifs du fait de la vaccination des animaux positifs du fait de l'infection par la souche sauvage (pour revue, Blasco *et al.*, 1997 ; Ducrottoy *et al.*, 2016). Cette même contrainte s'applique également à l'espèce Bouquetin, qui a présenté lors de l'expérimentation une séroconversion avec des titres d'anticorps élevés et persistant au moins pendant 3 mois, y compris chez une jeune femelle non mature sexuellement. La persistance prolongée des anticorps sériques chez le bouquetin est une limite supplémentaire, puisque cette classe d'âge est la plus communément capturée dans la nature, sur le site du Bargy⁷ (Marchand *et al.*, 2016). Si l'utilisation de la vaccination était appliquée *in natura*, il serait possible de suivre les individus vaccinés en les marquant d'une façon spécifique (S. Rossi com. pers). Toutefois, si des cas de transmission de la souche vaccinale étaient avérés du fait d'avortements post-vaccinaux par exemple, d'autres animaux pourraient présenter une séroconversion sans que l'on en connaisse la cause (Rev.1 ou souche sauvage), ni la durée de persistance des anticorps sériques. De telles séroconversions pourraient compliquer la surveillance (interprétation à tort de séropositifs vaccinés mais non infectés par la souche sauvage) et la gestion du foyer sauvage (euthanasie à tort d'animaux porteurs de souche vaccinale non marqués), puisqu'il n'existe pas, à ce jour, de technique sérologique réalisable *in vivo* et au chevet de l'animal, permettant de distinguer les animaux infectés par la souche sauvage des animaux vaccinés par la souche Rev.1.

Bien que la mission de ce groupe se limite à l'évaluation d'innocuité du vaccin, il conviendra de replacer les résultats de ce rapport dans le cadre d'une évaluation des stratégies de gestion (saisine Anses en cours). Au vu des connaissances acquises, nous rappelons que la mise en place d'une vaccination, a fortiori dans une population naturelle, se programmerait inévitablement sur une base pluriannuelle, notamment pour qu'une couverture vaccinale suffisante soit atteinte dans la population (Anses 2015, Rossi *et al.*, 2015). Il faut également souligner qu'aucune estimation de l'efficacité de cette vaccination (en termes de protection des bouquetins, réduction des avortements) n'a été réalisée au cours de cette expérimentation ; rappelons qu'un test d'efficacité ou d'innocuité sur femelles gestantes en bâtiments hautement confinés a été jugé très difficile à conduire en France au vu des limites techniques, réglementaires et éthiques actuelles en matière d'expérimentation animale (Anses et ONCFS 2016).

Concernant le bouquetin du Bargy, les difficultés sont liées à la capture des animaux, au coût des campagnes de vaccination et aux aspects logistiques associés, comme cela a déjà été mentionné par l'ONCFS (Anses et ONCFS 2016). En plus des contraintes de période de capture, évoquées plus haut, il faut rappeler les limites numériques des captures qui seront d'autant plus difficiles à garantir que les stratégies seront complexes et exigeront un « tri » des animaux en amont de leur capture (ex : stratégies sectorisées, par classe d'âge ou de sexe).

⁷ Pour mémoire la capture d'animaux avant 8 mois est presque impossible, les bouquetins femelles arrivent à maturité sexuelle entre deux et quatre ans selon les populations et les individus.

5.2.2 Risque associé à la vaccination pour l'Homme et le cheptel domestique

Concernant le risque environnemental que représenterait une vaccination *in natura* pour l'Homme et les espèces domestiques, l'excrétion de la souche vaccinale observée dans les urines de bouquetins ne pose *a priori* pas plus de risque que pour la souche sauvage déjà présente sur le site du Bargy, et vis-à-vis de laquelle ce mode de transmission a été jugé négligeable par un précédent groupe d'experts. La moindre survie de la souche Rev.1 dans l'environnement (Garin-Bastuji *com. Pers.*) permet même de présager que ce risque serait encore plus faible sur un même pas de temps. En revanche, les contaminations environnementales associées à des avortements post-vaccinaux pourraient également survenir, notamment en cas de vaccinations accidentelles de femelles gestantes, et l'excrétion de la souche vaccinale dans ce cas serait bien supérieure.

Bien que notre expérimentation ne démontre ni ne quantifie un taux d'avortement post-vaccinal chez le bouquetin (aucune évaluation de l'efficacité n'a été réalisée), la présence de la souche vaccinale dans les NL de la sphère urogénitale que nous observons chez les femelles bouquetins et le risque par ailleurs connu d'avortement brucellique associé à la vaccination de ruminants domestiques par la souche Rev.1 en cours de gestation, font évidemment craindre le pire scénario d'avortements brucelliques de femelles bouquetins suite aux campagnes de vaccination de printemps ainsi que la transmission accidentelle de la souche vaccinale à d'autres espèces (sauvages ou domestiques). Néanmoins, le risque que représenterait ce pire scénario est à relativiser par rapport à celui représenté par la large circulation de la souche sauvage de *Brucella melitensis* actuellement observée dans la population des bouquetins du Bargy, dont le potentiel zoonotique est très largement supérieur à celui de la souche vaccinale (Anses et ONCFS 2016).

Enfin, il convient de signaler qu'aucun résultat de cette expérimentation ne vient modifier l'avis de la précédente expertise collective sur la probabilité d'une réversion vers la virulence de la souche Rev.1, considérée comme négligeable (Anses, 2015, Anses et ONCFS 2016). Il faut ici rappeler que la possibilité d'un quelconque retour à la virulence suite à des recombinaisons avec des souches sauvages est considérée comme très improbable.

6. CONCLUSION GENERALE

Pour conclure, au vu de ces résultats, il apparaît que la distribution de la souche Rev.1, le risque d'excrétion et la réponse immunitaire humorale associés à la vaccination, testés selon un même plan expérimental entre le Bouquetin des Alpes (en captivité) et la Chèvre domestique, ne sont pas équivalents entre ces deux espèces. Le Bouquetin exprime une réponse immunitaire humorale plus intense et prolongée que la Chèvre domestique. La distribution et la charge par organe de la souche vaccinale sont également beaucoup plus importantes chez le Bouquetin des Alpes, en particulier au niveau de la sphère urogénitale. L'excrétion observée chez deux mâles bouquetins sur cinq a été associée à la transmission de la souche vaccinale au mâle témoin et à sa séroconversion. Sur la base de ces résultats, il apparaît que le Bouquetin des Alpes est plus sensible à la souche vaccinale Rev.1 que la Chèvre domestique, et présente, de ce fait, un risque possible d'excrétion et de diffusion intra-spécifique de la souche vaccinale. Les contraintes associées à l'utilisation du vaccin en nature (captures physiques des bouquetins à certaines périodes de l'année) sont par ailleurs de nature à favoriser la diffusion de cette souche et la séroconversion « à tort » d'animaux non infectés. Concernant le risque environnemental que représenterait une vaccination *in natura* pour l'Homme et les espèces domestiques, l'excrétion de la souche vaccinale observée dans les urines de bouquetins ne pose a priori pas plus de risque que pour la souche sauvage déjà présente sur le site du Bargy, et vis-à-vis de laquelle ce mode de transmission a été jugé négligeable par un précédent groupe d'experts. Le pire scénario d'un avortement brucellique lié à la souche vaccinale, d'une contamination environnementale avec transmission à d'autres espèces ne peut être exclu, mais le risque représenté par un tel scénario devrait être relativisé en regard du risque déjà représenté par la souche sauvage de *Brucella melitensis* circulant actuellement dans la population des bouquetins du Bargy (potentiel zoonotique supérieur à celui de la souche vaccinale). Ces conclusions ne sont pas définitives quant à l'utilisation du vaccin en nature, dont l'intérêt devra être examiné dans le cadre plus large de l'évaluation de stratégies de gestion opérationnelles.

7. REFERENCES

- AFNOR, 2004. Norme U 47-105. Isolement et identification de *Brucella* spp. autres que *B. ovis* et *B. canis*, AFNOR, avril 2004.
- AFNOR, 2009a. Norme U 47-003 - Recherche d'anticorps contre la brucellose par la technique de l'épreuve à l'antigène tamponné, AFNOR, avril 2009.
- AFNOR, 2009b. Norme U 47-004 - Recherche d'anticorps contre la brucellose par la microméthode de fixation du complément, AFNOR, avril 2009.
- Aguirre, A., & Starkey, E. E. (1994). Wildlife disease in US National Parks: historical and coevolutionary perspectives. *Conservation Biology*, 8(3), 654-661.
- Alton G.G., 1966. Duration of the immunity produced in goats by the Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. *J. Comp. Pathol.*, 76, 241-253.
- Alton G.G., 1968. Further studies on the duration of the immunity produced in goats by the Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. *J. Comp. Pathol.*, 78, 173-178.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Anses, 2015. Mesures de maîtrise de la brucellose chez les bouquetins du Bary. Avis de l'Anses et Rapport d'expertise collective SANT2014_SA_0218. Paris, 194 pp
- ANSES et ONCFS, 2016. Demande d'Appui Scientifique et Technique pour définir et évaluer bibliographiquement les critères préalables à une approche vaccinale contre la brucellose chez les bouquetins du massif du Bary. Rapport d'AST. Demande d'AST 2016-SA-0146. Paris, Juillet 2016, 29 pp.
- Banã M., 2002. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspect and field observations. *Vet. Microbiol.*, 90, 497-519.
- Blasco J.M., 1997. A review of the use of *B. melitensis* Rev.1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, 31, 275-283.
- Blasco J.M., Molina-Flores B., 2011. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(1), 95-104. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.003. Review
- Crosby E., Llosa L., Miro Quesada M., Carrillo C., Gotuzzo E., 1984. Hematologic changes in brucellosis. *J Infect Dis*, 150(3), 419-424.
- Ducrotoy M.J., Conde-Álvarez R., Blasco J.M., Moriyón I., 2016. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 171, 81-102. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002.
- Dankert J, Krijgsveld J, van Der Werff J, Joldersma W, Zaat SA, 2001. Platelet microbicidal activity is an important defense factor against viridans streptococcal endocarditis. *J Infect Dis.*, 184(5), 597-605
- Elberg S.S., 1959. Immunization against *Brucella* infection. 7. Immunological and epidemiological studies in Cordoba, Spain. *Bull World Health Organ*, 20, 1033-1052.
- Elberg S.S., 1981. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II. 1968-1980. *Vet Bull* 51, 67-73.
- Elberg S.S., 1996. Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. Part III. 1981-1995. *Vet Bull* 66, 1193-1200.
- Elberg S.S. and Faunce K., 1957. Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *J. Bact.*, 73, 211-217.
- Esteruelas, N. F., Huber, N., Evans, A. L., Zedrosser, A., Cattet, M., Palomares, F., ... & Arnemo, J. M., 2016. Leukocyte coping capacity as a tool to assess capture-and handling-induced stress in scandinavian brown bears (*Ursus arctos*). *Journal of wildlife diseases*, 52(2s), S40-S53.

Fensterbank R., Pardon P., Marly J., 1985. Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. Ann. Rech. Vét., 16, 351-358.

Fensterbank R., Verger J.M., Grayon M., 1987. Conjunctival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain REV 1. Ann. Rech. Vét., 18, 397-403.

Ferroglio, E., Tolari, F., Bollo, E., & Bassano, B., 1998. Isolation of *Brucella melitensis* from alpine ibex. Journal of wildlife diseases, 34(2), 400-402.

Freycon P. (2015). Rôle du Bouquetin *Capra ibex* dans l'épidémiologie de la brucellose à *Brucella melitensis* en Haute-Savoie. Thèse vétérinaire, VetAgroSup Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1.

Garin-Bastuji, B., Oudar, J., Richard, Y., & Gastellu, J., 1990. Isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the southern French Alps. Journal of wildlife diseases, 26(1), 116-118.

Hars, J., Rautureau, S., Jaÿ, M., Game, Y., Gauthier, D., Herbaux, J. P., ... & Mick, V. (2013). Un foyer de brucellose chez les ongulés sauvages du massif du Bargy en Haute-Savoie. Bull. Epidemiol. Santé Anim. Alim, 60, 2-6.

Hars J., Rautureau S., Vaniscotte A., Herbaux Jp., Pasquier Jj., Depecker A., Le Bourg V., Game Y., Toigo C., Mick V., Garin-Bastuji B., (2015). La brucellose des bouquetins du massif du Bargy (Haute-Savoie) : où en est-on en 2015 ? Bulletin épidémiologique, 70, 14-18

Iacoboni, P. A., Hasenauer, F. C., Caffaro, M. E., Gaido, A., Rossetto, C., Neumann, R. D., & Rossetti, C. A. (2014). Polymorphisms at the 3' untranslated region of SLC11A1 gene are associated with protection to *Brucella* infection in goats. Veterinary immunology and immunopathology, 160(3), 230-234.

Garrido F., 1992. Rev.1 and B19 vaccine control in Spain. Observations on the handling and effectiveness of Rev.1 vaccine and the immune response. In : Plommet M. (Ed.) , Prevention of brucellosis in the Mediterranean countries. Pudoc Scientific Publishers, 223-231.

Koch, R. E., & Hill, G. E., 2017. An assessment of techniques to manipulate oxidative stress in animals. Functional Ecology, 31(1), 9-21.

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2016. Chapter 2.1.4. Infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*. OIE, Paris.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf

Mailles A., Rautureau S., Le Horgne J.M., Poignet-Leroux B., d'Arnoux C., Dennetière G., Faure M., Lavigne J.P., Bru J.P., Garin-Bastuji B., 2012. Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. Euro Surveill, 17, 30. pii: 20227

Marchand P., Hars J., Herbaux JP., Game Y., 2016. Suivis sanitaires et populationnels des bouquetins du massif du Bargy et des massifs adjacents. Bilan des opérations réalisées en 2015. Rapport technique ONCFS. 25pp.

Minas A., 2006. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. Small Ruminants Res., 62, 101-107.

Muñoz P.M., de Miguel M.J., Grilló M.J., Marín C.M., Barberán M., Blasco J.M., 2008. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. Vaccine, 21, 2562-2569.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2017. Revisiting Brucellosis in the Greater Yellowstone Area. Washington, DC: The National Academies Press. doi:<https://doi.org/10.17226/24750>

Nielsen K., Gall D., Smith P., Balsevicius S., Garrido F., Ferrer M.D., Biancifiori F., Dajer A., Luna E., Samartino L., Bermudez R., Moreno F., Renteria T., Corral A., 2004.

Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Rev Sci Tech*, 23(3), 979-987.

Olsen S. C., Cheville N. F., Kunkle R. A., Palmer M. V., Jensen A. E., 1997. Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of bison (*Bison bison*) vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Wildl. Dis.*, 33, 146–151.

Olsen S. C., Jensen A. E., Palmer M. V., Stevens M. G., 1998. Vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51: Serology, lymphocyte proliferative responses, clearance, and biosafety. *Am. J. Vet. Res.* 59:410– 415.

Olsen S. C., 2000. Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet. Ther.* 1:183–191.

Olsen S.C., Johnson C., 2011. Comparison of abortion and infection after experimental challenge of pregnant bison and cattle with *Brucella abortus* strain 2308. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(12), 2075-2078.

Praud A., Champion J.L., Corde Y., Drapeau A., Meyer L., Garin-Bastuji B., 2012. Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet Res*, 8, 68. doi: 10.1186/1746-6148-8-68

Rahman A.K., Saegerman C., Berkvens D., Fretin D., Gani M.O., Ershaduzzaman M., Ahmed M.U., Emmanuel A., 2013. Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of indirect ELISA, Rose Bengal Test and Slow Agglutination Test for the diagnosis of brucellosis in sheep and goats in Bangladesh. *Prev Vet Med*, 110(2), 242-252. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.11.029. Epub 2012 Dec 29.

Rossi, S., Staubach, C., Blome, S., Guberti, V., Thulke, H. H., Vos, A., ... & Le Potier, M. F. (2015). Controlling of CSFV in European wild boar using oral vaccination: a review. *Frontiers in microbiology*, 6.

Ruhnau, J., Schulze, J., Dressel, A., & Vogelgesang, A. (2017). Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. *Journal of immunology research*, 2017.

Stournara A., Minas A., Bourtzi-Chatzopoulou E., Stack J., Koptopoulos G., Petridou E., Sarris K., 2007. Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*. *Vet. Microbiol.*, 119, 53-64.

Vacca, G. M., Pazzola, M., Pisano, C., Carcangiu, V., Diaz, M. L., Nieddu, M., ... & Dettori, M. L., 2011. Chromosomal localisation and genetic variation of the SLC11A1 gene in goats (*Capra hircus*). *The Veterinary Journal*, 190(1), 60-65.

Zundel E, Verger J.M., Grayon M., Michel R., 1992. Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses. *Ann. Rech. Vét.*, 23, 177-188.

8. ANNEXES

8.1. Courrier interministériel du 26 septembre 2016

8.2. Convention du consortium