

Evaluation du statut de cheptels laitiers vis-à-vis de la paratuberculose par combinaison de tests de dépistage direct et indirect

JOLY A. (1,2), BEAUDEAU F. (1), GUATTEO R. (1), FOURICHON C. (1), SEEGER H. (1), ROGER G. (2),
(1) Unité Mixte BioEpAR 1300, Oniris, INRA, 44300, Nantes, France
(2) Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire, 56003, Vannes, France

RESUME

L'objectif de cette étude était d'évaluer la valeur informative de différentes analyses de mélange pour classer les troupeaux bovins laitiers selon le risque de détenir des animaux excréteurs de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, agent de la paratuberculose. Dans 55 troupeaux bovins laitiers avec historique de Paratuberculose connu, différentes analyses (ELISA, PCR, combinaison culture/PCR) ont été réalisées 1°) sur des prélèvements de lait et/ou de fèces individuels, 2°) sur des petits mélanges reconstitués au laboratoire à partir de ces prélèvements individuels et 3°) sur des prélèvements d'environnement. La sensibilité de différentes combinaisons d'analyses a été évaluée. Elles étaient basées sur la réalisation soit d'ELISA sur des laits de mélange ciblés selon le rang de lactation soit sur des PCR ou des couplages culture/PCR faits sur les fèces prélevées dans l'environnement ou sur des vaches en première lactation. Par rapport aux programmes de certification (analyses individuelles sur tous les animaux), la combinaison retenue (sérologie sur lait de petit mélange des vaches en seconde et en quatrième lactation, PCR sur l'environnement) permet de réduire considérablement les coûts avec un niveau de sensibilité équivalent à celui apporté par la méthode habituellement utilisée. Elle laisse entrevoir la possibilité de discriminer les troupeaux négatifs et les troupeaux positifs, tout en classant ces derniers selon 2 niveaux de risque, liés à la présence ou non d'animaux excréteurs.

Classification of dairy herds by a combination of tests to assess the risk of detaining animals shedding *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*,

JOLY A. (1,2), BEAUDEAU F. (1), GUATTEO R. (1), FOURICHON C. (1), SEEGER H. (1), ROGER G. (2),
(1) Unité Mixte BioEpAR 1300, Oniris, INRA, 44300, Nantes, France

SUMMARY

The aim of this study was to assess the informative value of pooled samples to determine the status of dairy herds for Paratuberculosis. In 55 dairy herds with a history of Paratuberculosis, several tests (ELISA, PCR, paraJEM®) were implemented both on individual milk or faeces samples, on pooled samples and environmental samples. The sensitivity of a combination of tests based on Elisa applied to pooled milk according to the rank of lactation and PCR or paraJEM® applied to environmental or young animal faeces was very efficient according to the accuracy sought. In comparison to the reference technique (exhaustive testing of all animals), the proposed method allowed considerably reducing the costs with the same level of sensitivity. The method can discriminate negative and positive herds ; in addition, positive herds can be classified into two levels, according to the presence of shedders.

INTRODUCTION

La Paratuberculose ou maladie de Johne est une maladie chronique, infectieuse, contagieuse due à la prolifération d'une mycobactérie *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), appelée aussi Bacille de Johne. Les principaux signes cliniques de la Paratuberculose, sont une diarrhée chronique, incurable, survenant le plus souvent après le premier ou le second vêlage; l'amaigrissement est progressif et irrémédiable.

Cette maladie a un impact économique extrêmement important. Par exemple, des pertes de production ont été mises en évidence et chiffrées dans une étude (Beauveau *et al.*, 2007) portant sur 15 490 vaches issues de 569 troupeaux. Les auteurs mettent en évidence que la production laitière journalière moyenne par vache est significativement inférieure chez les vaches issues de troupeaux contenant au moins une vache infectée en comparaison avec les vaches issues de troupeaux régulièrement contrôlés négatifs. Les pertes de production laitière ont été évaluées à 1,6, 2,5, 2,1 et 6,2 Kg/jour respectivement pour les vaches testées négatives dans un troupeau positif, les séropositives non vaccinées, les PCR ou Culture Fécale positives et enfin les animaux atteints de diarrhée (stade avancé de la maladie).

A l'échelon local, il est difficile de connaître la prévalence réelle de la maladie, compte tenu d'une part du défaut de sensibilité des tests, d'autre part de la difficulté qu'ont les gestionnaires de la santé, et notamment les Groupements de Défense Sanitaire, à coordonner leurs objectifs en matière de maîtrise de la Paratuberculose. Les tests disponibles à ce jour ne permettent pas de détecter tous les animaux infectés. Plusieurs techniques sont disponibles. Les plus fréquemment utilisées sont les techniques ELISA appliquées au sang ou au lait, dont la sensibilité est relativement mauvaise (entre 30 et 80 % selon les kits et les auteurs). En outre, elle varie selon le stade évolutif de l'infection. La spécificité des ELISA sur sérum est fréquemment comprise entre 90% et plus de 99% (Coquin, 2007). La mise en évidence des mycobactéries dans les matières fécales est possible grâce à des techniques de culture sur milieu spécifique ou des techniques PCR. La sensibilité de ces méthodes reste également médiocre (entre 20 et 40 %). La spécificité est bonne et proche de 100 % en conditions de terrain, même si la séquence détectée par les sondes PCR (IS 900) est également présente chez d'autres mycobactéries. Depuis peu, une technique nouvelle qui combine culture en milieu liquide pendant 42 jours suivie de PCR réalisée sur le milieu de culture (nom commercial paraJEM®) semble améliorer la sensibilité de façon assez conséquente (Daly *et al.*, 2009).

Enfin, il convient de rappeler l'absence de réelle technique de référence, ce qui provoque toujours des débats sur les niveaux de sensibilité et de spécificité des différents outils.

Si l'assainissement des élevages infectés est un objectif visé par la plupart des GDS, la maîtrise des nouvelles infections peut également être envisagée au travers de dispositifs destinés à garantir les animaux commercialisés. Un dispositif national est disponible en France, sous l'autorité de l'ACERSA, mais ne concerne qu'un nombre très faible d'élevages, le plus souvent vendeurs d'animaux de très haute valeur génétique ou de mâles reproducteurs destinés aux stations de testage. Mais force est de constater que la plupart des éleveurs régulièrement vendeurs d'animaux reproducteurs (génisses amouillantes, vaches en lactation) ne connaissent pas le statut de leur troupeau vis à vis de l'infection par MAP et contribuent donc à infecter de nouveaux troupeaux.

Les GDS du Grand Ouest (Bretagne, Pays de Loire et Normandie) ont engagé et partagé avec l'UMT Maîtrise de la Santé des Troupeaux Bovins une réflexion sur le long terme visant à organiser les mouvements d'animaux en fonction du risque Paratuberculose. L'objectif de ce projet est de concevoir et d'évaluer des dispositifs de définition et d'utilisation de statuts de cheptels s'appuyant sur une analyse de risque et reposant sur le principe de flux orientés des bovins entre cheptels selon ces statuts (un cheptel ne pouvant introduire des bovins que s'ils sont issus de troupeaux à statut équivalent ou plus favorable).

L'objectif de cette étude préliminaire, menée sur un échantillon restreint et stratifié de 55 troupeaux laitiers, est d'évaluer la valeur informative d'analyses effectuées sur des prélèvements de petit mélange et d'essayer d'identifier la (les) combinaison(s) la (les) plus pertinente(s) possible(s).

1. MATERIEL METHODES

1.1. CHOIX DES ELEVAGES

55 élevages bovins laitiers bretons détenant en moyenne 40 vaches laitières ont été recrutés en fonction de leur prévalence attendue vis à vis de la Paratuberculose. 10 d'entre eux étaient des élevages régulièrement contrôlés négatifs au regard du référentiel technique de l'ACERSA. Les 45 autres avaient fait l'objet de prélèvements individuels dans les 6 mois précédents et étaient *a priori* répartis en 3 classes : faiblement contaminés (séroprévalence apparente $\leq 3\%$), moyennement contaminés (3 à 10 %) et fortement contaminés ($> 10\%$). Il n'a pas été tenu compte des réformes réalisées entre la date de la dernière analyse et la date de l'inclusion. Le choix des élevages s'est fait sur la base du volontariat et de la facilité à réaliser les prélèvements.

1.2. CHOIX DES PRELEVEMENTS

1.2.1. Réalisation des prélèvements élémentaires

Dans tous les élevages, les prélèvements suivants ont été réalisés :

- 40 ml de lait individuel sur toutes les vaches en lactation
- 40 g de fèces individuel sur toutes les vaches en lactation
- 40 ml de lait de grand mélange, directement prélevé dans le tank (LT)
- 40 g de fèces sur l'aire d'attente, prélevés en 5 ou 6 points différents (AA)
- 40 g de fèces sur l'aire d'exercice, prélevés en 5 ou 6 points différents (AE)

1.2.2. Constitution des prélèvements de petit mélange

A partir des prélèvements individuels les mélanges suivants ont été reconstitués :

- mélanges de 5 laits individuels, ajustés selon la parité. Par exemple, dans un élevage où étaient présentes 13 vaches en première lactation (L1), 3 mélanges de 5 laits individuels ont été constitués, (2

laits individuels contribuant chacun dans cet exemple à 2 mélanges différents). Le même principe a été appliqué pour les vaches en deuxième lactation (L2), pour les vaches en troisième lactation (L3) et pour les vaches en quatrième lactation ou plus (L4+).

- mélanges de 5 laits individuels à partir de vaches vèlées depuis moins de 2 mois (RV), sans tenir compte de la parité.
- mélanges de 5 fèces individuels, ajustés selon la parité, réalisés selon les mêmes principes que les mélanges de lait individuels.

1.3. CHOIX DES ANALYSES

Les prélèvements ainsi réalisés ont été soumis aux analyses décrites dans le tableau 1. Pour les ELISA, nous avons choisi les kits commercialisés par la société LSI et par IdVet. Pour la PCR et le paraJEM®, nous avons choisi les kits commercialisés par la société LSI.

Tableau 1 Nature des analyses mises en oeuvre

Analyse	Support	Kits utilisés
ELISA Ac	lait individuel lait de petit mélange lait de tank	2 kits commerciaux
PCR	fèces individuel	1 kit PCR commercial
PCR et PCR après culture	fèces de petit mélange fèces aire d'attente (AA) fèces aire d'exercice(AE) lait de tank (LT)	1 kit PCR commercial et paraJEM®

1.4. MODALITES D'EXPLOITATION DES RESULTATS

1.4.1 Expression des résultats

Les résultats ont été fournis selon les modalités prévues par les fabricants de réactifs, à la fois en données qualitatives (Positif, Douteux, Négatif) et quantitatives (Rapport E/P de l'ELISA ou valeur du Ct pour la PCR). Concernant les analyses ELISA réalisées sur les laits de petit mélange ou sur le lait de tank, les seuils fournis par le fabricant pour les analyses individuelles ont été appliqués. Concernant le paraJEM®, seuls les résultats de la PCR réalisée à l'issue des 42 jours de culture ont été pris en compte.

1.4.2 Analyse des résultats

1^{ère} étape : Classement des cheptels selon la méthode de référence

La référence de classement a été obtenue par la combinaison des analyses individuelles sur lait (ELISA) et fèces (PCR). Les cheptels ont été classés en 3 catégories de référence : catégorie A (« cheptel négatif »), lorsque toutes les ELISA individuelles et les PCR réalisées sur fèces individuels se sont avérées négatives, catégorie B (« cheptel séropositif ») lorsque au moins une ELISA s'est avérée positive et toutes les PCR négatives, catégorie C (« cheptel excréteur ») lorsqu'au moins une PCR individuelle était positive, quelque soit le nombre d'ELISA positives.

2^{ème} étape : Classement des cheptels selon les résultats des outils simples

Les cheptels ont également été classés en 2 catégories (Positif ou Négatif) selon les résultats des analyses réalisées sur des petits mélanges ou sur les prélèvements d'environnement. Ce classement a été réalisé pour chaque outil testé, selon le principe suivant : par exemple, lorsque les sérologies ELISA réalisées sur les laits de petit mélange des 1^{ères} lactations étaient toutes négatives, le cheptel était classé négatif au vu des ELISA L1. A l'inverse, si au moins 1 des petits mélanges s'avérait positif sur ces mêmes prélèvements le cheptel était classé positif.

Au total, chaque cheptel était classé positif ou négatif pour 21 outils simples différents (ELISA L1, L2, L3, L4+, LT, RV, PCR fèces L1, L2, L3, L4+, RV, AA, AE, PCR LT, paraJEM® fèces L1, L2, L3, L4+, AA, AE, paraJEM® LT).

Pour chaque outil simple, nous avons comptabilisé le nombre de cheptels positifs et négatifs (tableau 2).

Tableau 2 Principes de classement des cheptels selon la technique d'analyse choisie

Nombre de troupeaux positifs selon la référence	Nombre de troupeaux Pos avec l'outil concerné	Nombre de troupeaux Neg avec l'outil concerné (ex ELISA L1)
A	a	a'
B	b	b'
C	c	c'

3^{ème} étape : Analyse des qualités intrinsèques des outils simples (Calcul de la sensibilité et de la spécificité)

Les valeurs de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp) de chaque outil simple ont ensuite été calculées par rapport au classement de référence. Elles ont été calculées selon 2 modalités : d'une part pour repérer les cheptels C et les discriminer par rapport aux à l'ensemble des autres (dans notre exemple, Se est égal à $c / (c+c')$ et Sp à $(a'+b') / (a+a'+b+b')$ et d'autre part pour repérer l'ensemble des cheptels contaminés (B+C), Se étant alors égale à $(b+c) / (b+b'+c+c')$ et la Sp à $(a') / (a+a')$

4^{ème} étape : Analyse des qualités intrinsèques des outils combinés

A partir des données de sensibilité et spécificité calculées pour les outils simples, nous avons ensuite recherché les combinaisons d'outils permettant d'obtenir les meilleures Se et Sp par rapport à la méthode de référence. Le travail a été effectué pour toutes les combinaisons possibles à partir de 2, 3 ou 4 outils simples. Par exemple, nous avons combiné les résultats donnés par l'ELISA sur le lait de tank et la PCR réalisée sur les prélèvements d'environnement. Lorsque au moins 1 des résultats était positif, la combinaison était bien entendue considérée comme positive. Nous avons au total testé plusieurs dizaines de combinaison. Nous avons ensuite recalculé les sensibilités et spécificités des combinaisons selon les mêmes modalités que pour les outils simples.

2. PRINCIPAUX RESULTATS

Au total, 2091 vaches ont été prélevées dans les 55 cheptels initialement choisis. Près de 600 petits mélanges de lait et de fèces ont été réalisés, soit en moyenne 11 par élevage.

Le classement des cheptels selon la méthode de référence a permis de considérer 6 cheptels en A, 22 en B et 27 en C (tableau 3). Dans ces 2 dernières catégories, on observe une variabilité importante à la fois pour la séroprévalence (de 0 à 15 séropositifs par cheptel) et l'excrétion (de 1 à 15 positifs).

Concernant les résultats donnés par les outils simples, nous n'en avons retenu que certains (tableau 4). L'ELISA réalisée sur des mélanges de 5 laits des vaches en deuxième lactation (ELISA L2) permet de détecter 15 des 27 troupeaux C (Se= 0,56) ou 17 des 49 troupeaux B ou C (Se= 0,35) (tableaux 5 et 6). Les sensibilités de l'ELISA sur les L4+ sont comparables (respectivement 0,59 et 0,37). La sensibilité de la PCR réalisée sur des fèces prélevées sur l'aire d'exercice pour détecter les troupeaux excréteurs est de 0,44 alors que celle de la technique paraJEM® appliquée aux mêmes prélèvements est de 0,74 (meilleure sensibilité individuelle obtenue) pour détecter les C et de 0,55 pour les B et C. A noter enfin que la sensibilité de l'ELISA lait de tank est de 0,44 pour détecter les troupeaux C. Pour l'ELISA L3, elle n'est que de 0,11. Enfin, ni la PCR ni le paraJEM® appliqués au lait de tank ne sont performants (Se= 0)

Tableau 3 Répartition des troupeaux selon la méthode de référence

Catégorie	Nombre	%
A (négatifs)	6	11
B (séropositifs)	22	40
C (excréteurs)	27 ¹	49
Total	55	100

¹ dont 2 sans vaches séropositives

Tableau 4 Nombre de troupeaux détectés par quelques outils simples en comparaison avec la référence.

Catégorie (nombre)	ELISA L2	ELISA L4+	PCR AA	paraJEM® AA
A (6)	0	0	0	1
B (22)	2	2	2	7
C (27)	15	16	12	20

Tableau 5 Sensibilité de quelques outils simples calculée pour repérer les cheptels excréteurs (C)

	ELISA L2	ELISA L4+	PCR AA	paraJEM® AA
Se	0,56	0,59	0,44	0,74

Tableau 6 Sensibilité et spécificité de différents outils simples calculées pour repérer l'ensemble des cheptels contaminés (B et C)

Critère	ELISA L2	ELISA L4+	PCR AA	paraJEM® AA
Se	0,35	0,37	0,29	0,55
Sp	1	1	1	0,83

Tableau 7 Nombre de troupeaux détectés par des combinaisons d'outils simples ne faisant pas appel à des prélèvements de fèces individuels.

Classement selon la méthode de référence	Nb de troupeaux positifs selon les combinaisons	
	E L2, E L4+, PCR AA	EL2, E L4+, paraJEM® AA
A	6	1
B	22	10
C	27	25

Tableau 8 Nombre de troupeaux détectés par des combinaisons d'outils faisant appel à des prélèvements de fèces individuels.

Classement selon la méthode de référence	Nb de troupeaux positifs selon les combinaisons	
	E L2, E L4+, paraJEM® L1	
A	6	1
B	22	12
C	27	26

Concernant les résultats obtenus par des outils combinés, nous avons retenu les résultats de combinaisons associant les 2 principes d'analyse (recherche d'anticorps d'une part, et de la mycobactérie d'autres part sur des cibles potentiellement différentes). Les principaux résultats d'intérêt concernent des combinaisons ELISA et PCR sur des prélèvements d'environnement (tableau 7). La sensibilité de la combinaison ELISA sur les L2 et les L4+ associée à une PCR sur l'aire d'attente est de 0,55 (27/49) pour détecter l'ensemble des troupeaux contaminés (B+C) et de 0,78 (21/27) pour repérer les troupeaux excréteurs (C). Elle est respectivement de 0,71 et de 0,93 si on remplace la PCR par une paraJEM®.

Les derniers résultats d'intérêt concernent une combinaison d'outils ELISA appliqués aux L2 et aux L4+ associés à une paraJEM® réalisée sur des mélanges de fèces des vaches en première lactation (Se= 0,96 pour les C et 0,77 pour les B+C) (tableau 8).

Enfin, d'autres combinaisons ont été testées (en ajoutant 1 ou plusieurs outils simples) permettant le plus souvent d'augmenter la sensibilité (Joly *et al.*, 2009). A noter que 5 troupeaux classés A restent négatifs quelles que soient les combinaisons testées. Il s'agit de cheptels présumés négatifs au vu des critères définis par le cahier des charges de l'ACERSA.

3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude préliminaire sont très prometteurs.

Le premier intérêt de cette étude est de montrer que la combinaison d'analyses sérologiques et bactériologiques (au sens large), ciblées sur des classes d'âge différentes est très pertinente pour optimiser les chances de détecter les troupeaux infectés : les meilleurs classements sont obtenus en réalisant des analyses ELISA sur les animaux les plus âgés et la recherche de mycobactérie dans l'environnement ou chez des jeunes animaux (vaches en première lactation).

Le deuxième intérêt de cette étude est de suggérer l'avantage d'une démarche en plusieurs étapes en utilisant des outils différents selon les objectifs. En effet, une première combinaison d'analyses simples à mettre en oeuvre (ELISA de petit mélange sur les deuxièmes et quatrièmes lactations et plus) permet de détecter plus de 60% des troupeaux excréteurs et une petite partie (1/6) des troupeaux "séropositifs". Si l'objectif est de détecter les troupeaux excréteurs, la réalisation d'une PCR, ou, mieux, d'une paraJEM® sur des prélèvements d'environnement peut s'avérer suffisante. Si au contraire l'objectif est de détecter la majorité des troupeaux non négatifs, une paraJEM® réalisée dans un second temps sur des prélèvements de fèces individuelles analysées en mélanges de 5, contribue à améliorer la sensibilité de la méthode.

La méthode retenue pour effectuer notre classement de référence (association sérologie et PCR individuelles sur toutes les vaches en lactation) est plus robuste que celle habituellement recommandée dans les programmes de certification qui suivent les préconisations du référentiel technique de l'ACERSA. Quand les calculs de sensibilité des outils simples et des combinaisons sont refaits par rapport à une seule technique (ELISA individuelle OU PCR individuelle), toutes les valeurs de sensibilité sont augmentées, et atteignent 1 pour certaines d'entre elles. A l'inverse, la spécificité est alors dégradée, mais on est en droit d'évoquer un défaut de sensibilité de la méthode habituelle plutôt qu'un défaut de spécificité de la méthode proposée ici. A ce titre, des investigations complémentaires (reprise des animaux en PCR individuelle 3 mois plus tard) dans l'élevage classé A mais détecté positif par la combinaison ELISA L2 ELISA L4+ et paraJEM® sur l'aire d'attente montrent qu'il s'agit bien d'un élevage infecté et donc d'un faux négatif par la méthode habituelle et non pas d'un faux positif par notre méthode.

Le troisième intérêt de cette étude concerne les coûts : compte tenu des tarifs habituellement pratiqués par les laboratoires d'analyse, le coût des analyses nécessaires au classement d'un troupeau de 40 vaches laitières par la méthode de référence est d'environ 1520 euros HT. Pour une qualification de type ACERSA, il serait de 320 ou de 1200 euros environ selon la technique choisie (ELISA ou PCR). Avec la méthode proposée, il n'est que de 60 euros pour détecter un élevage C ou de 135 euros pour détecter un élevage B ou C (analyses sur mélanges de fèces individuelles).

Bien évidemment, il est important de consolider les premières informations apportées par ce protocole. Plusieurs points méritent d'être traités :

- confirmation sur plusieurs centaines d'élevages de l'intérêt des combinaisons privilégiées ici,
- recherche sur les mêmes élevages d'autres combinaisons d'intérêt,
- calcul des sensibilités et spécificités des différents outils et combinaisons sur plusieurs centaines de troupeaux,
- exploitation des données quantitatives fournies par les tests pour ajuster les seuils en ELISA de mélange,
- adaptation de la méthode aux élevages allaitants.

Pour répondre à ces différentes interrogations, un protocole sera mis en oeuvre en 2010 dans 400 élevages (dont une centaine d'allaitants et une centaine de troupeaux présumés indemnes). Les résultats sont espérés pour mi-2011 et devraient permettre de proposer une méthode reconnue de classement des cheptels selon leur statut vis à vis de la Paratuberculose. Ces statuts pourraient servir de base à des règles de commercialisation des animaux, un élevage ne pouvant s'approvisionner qu'à partir d'élevages de statut au moins équivalent.

4. CONCLUSION

Si l'objectif de définir un statut d'élevage vis-à-vis de la paratuberculose a déjà fait l'objet de divers travaux, cette étude est novatrice sur plusieurs points. D'une part, la discrimination des cheptels est réalisée par une association d'analyses directes et indirectes. D'autre part, les outils utilisés sont des combinaisons pertinentes de petits mélanges issus de prélèvements réalisés sur des animaux ciblés et/ou sur l'environnement. Enfin, les matrices employées (notamment le lait), ainsi que les mélanges réalisés permettent de réduire de manière très conséquente le coût de l'établissement d'un tel statut en élevage.

De nombreuses données sont encore à exploiter et viendront affiner les résultats. Il s'agit des informations semi-quantitatives des tests utilisés, dont l'exploitation suggère la possibilité de faire varier les seuils de positivité.

La validation à grande échelle des méthodes suggérées par cette étude et leur adaptation aux élevages allaitants laissent entrevoir une généralisation possible de la connaissance des statuts des troupeaux et une organisation des échanges commerciaux susceptible de contribuer à la maîtrise des nouvelles infections.

Merci aux 55 éleveurs pour leur contribution à ce travail, aux préleveurs pour leur grande rigueur dans la collecte et la constitution des échantillons, au personnel du laboratoire d'analyses d'Ille et Vilaine (ISAE), à Youna Delbrouck pour son travail de mise en forme et d'exploitation des premiers résultats, au GIE lait viande et au Conseil Régional de Bretagne pour leur soutien financier.

Beaudeau F., Belliard M., Joly A., Seegers H., Vet. Res, 38 , 625-634,2007.

Coquin A., Thèse Vétérinaire, Nantes 2007-065.

Daly S., Caquineau L., Legall G., Mercier G., Roger G.,

Joly A., Sellal E., European Buiatric Forum, Marseille, 2009.

Joly A., Roger G., Beaudeau F., Guatteo R., Fourichon C., Le Dréan E., Doré C., European Buiatric Forum, Marseille , 2009.